

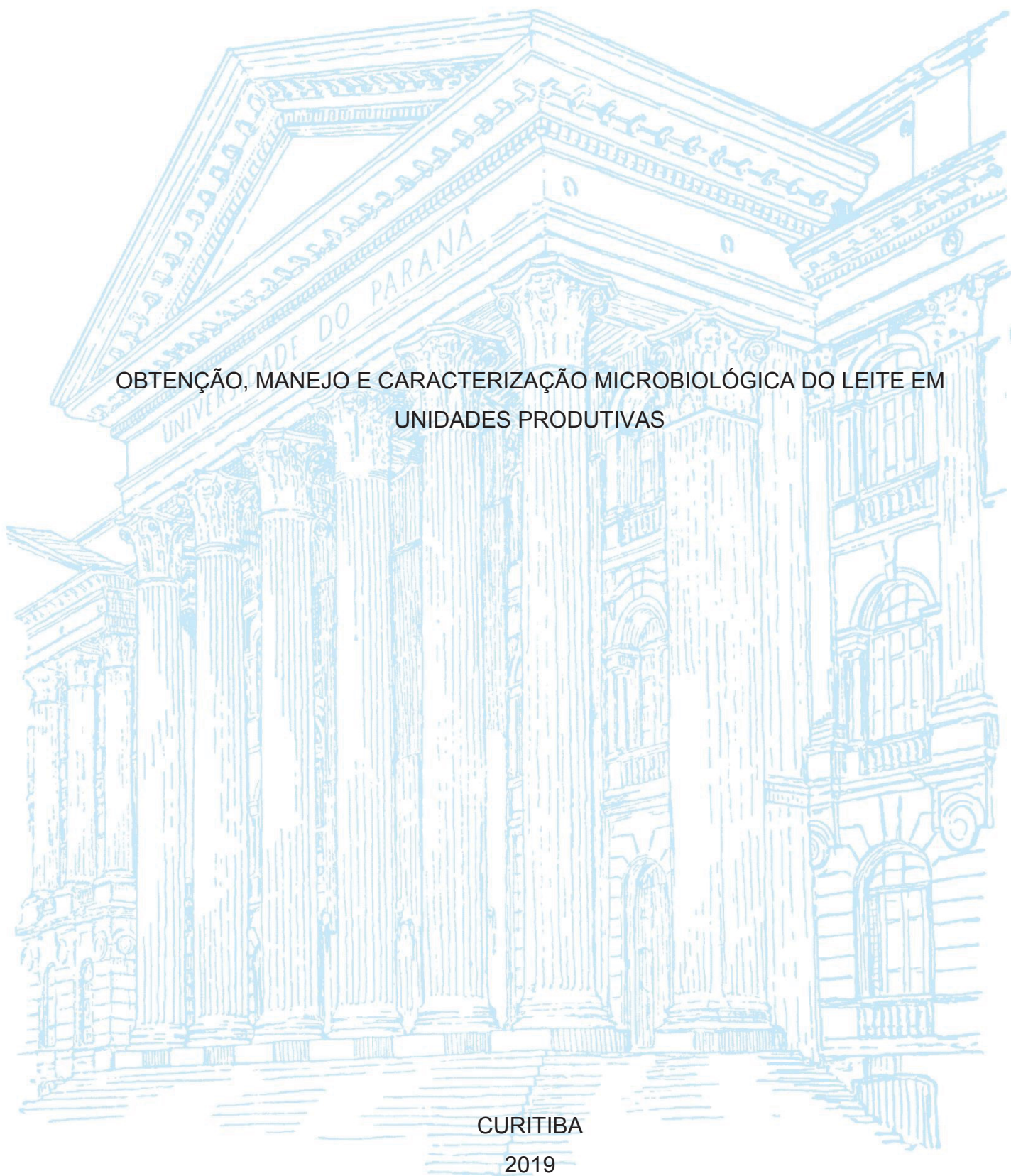
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUANY YONE MIYOSHI

OBTENÇÃO, MANEJO E CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO LEITE EM  
UNIDADES PRODUTIVAS

CURITIBA

2019



LUANY YONE MIYOSHI

OBTENÇÃO, MANEJO E CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO LEITE EM  
UNIDADES PRODUTIVAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Saúde Única, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientadora: Professora Dra. Julia Arantes Galvão

CURITIBA

2019

Miyoshi, Luany Yone  
M685o Obtenção, manejo e caracterização microbiológica do leite em unidades produtivas / Luany Yone Miyoshi. - Curitiba, 2019. 70 p.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.  
Orientadora: Julia Arantes Galvão

1. Leite - produção - Paraná. 2. Leite - bacteriologia. 3. Leite - contaminação. 4. Ordenha. I. Galvão, Julia Arantes (Orientadora). II. Título. III. Universidade Federal do Paraná.

CDU 636.2.034(816.2)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS  
VETERINÁRIAS - 40001016023P3

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS VETERINÁRIAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de LUANY YONE MIYOSHI intitulada: **OBTENÇÃO, MANEJO E CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO LEITE EM UNIDADES PRODUTIVAS**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APPROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 28 de Março de 2019.



JULIA ARANTES GALVÃO

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)



IVAN ROQUE DE BARROS FILHO

Avaliador Interno (UFPR)



KÄTE APARECIDA BUZI

Avaliador Externo (UNICENTRO)

## **AGRADECIMENTOS**

Quero agradecer primeiramente a Deus que permitiu que tudo isso acontecesse, sempre esteve ao meu lado, seja nos momentos de alegria ou nos mais difíceis da minha vida e que me concedeu saúde ao longo dessa jornada.

À minha família, em especial a minha mãe pelo amor e apoio incondicional e ao meu pai que não está mais presente, mas ficaria orgulhoso dessa grande conquista em minha vida. Amo muito vocês e sou eternamente grata.

À minha orientadora, prof.<sup>a</sup> Julia, por todo o apoio, orientação, confiança, correções e incentivos. Sempre muito paciente, atenciosa, com pensamentos positivos e que tudo daria certo, por mais que parecia que tudo daria errado.

Ao meu namorado, Marcos, por sempre acreditar em mim e ter me aguentado nesses dois anos de mestrado, com as incertezas, medos e angústias.

Aos colegas do laboratório LACQSA que me ajudaram nas coletas e processamento de amostras.

À minha amiga Maria Beatriz que, apesar de longe, me dava conselhos e força em todos os momentos.

Aos professores Ivan, Juliana, Kate e Rafaella. Agradeço pelas correções e por terem aceito participar da minha banca.

À UFPR, seu corpo docente e seus funcionários por me proporcionarem valores e conhecimentos no âmbito profissional e pessoal.

À Secretaria de Agricultura de São José dos Pinhais, pelas informações e toda a ajuda.

Ao Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal – UFV, que me permitiu realizar parte dessa dissertação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

E a todos que de qualquer forma, fizeram parte dessa importante etapa, o meu eterno agradecimento.

## RESUMO

A presente dissertação foi dividida em três capítulos. O capítulo 1 refere-se à introdução geral sobre o leite, atividade leiteira, contaminação microbiológica, micro-organismos do leite, boas práticas na ordenha e resistência de cepas de *Staphylococcus aureus* a antibióticos. O capítulo 2 refere-se ao estudo da associação da contaminação bacteriana da ordenha com as práticas executadas na ordenha. Participaram da pesquisa 14 propriedades rurais e foram caracterizadas quanto ao perfil socioeconômico dos ordenhadores e microbiológico dos principais pontos de contaminação na ordenha. Foram enumerados aeróbios mesófilos (AM), coliformes totais (CT), estafilococos coagulase positiva (ECP) e pesquisada a *Salmonella* spp. Diante dos resultados observados descritos nesta dissertação foi possível correlacionar as contagens de AM com ECP e AM com CT. Também ficou claro que a contaminação da ordenha foi influenciada pelo conhecimento, realização ou não das boas práticas, condições das instalações e volume de produção. No capítulo 3 está descrito o isolamento de *S. aureus* de diferentes amostras do ambiente de ordenha de vacas leiteiras e de seu perfil de resistência a antibióticos. Isolados bacterianos foram submetidos a análises fenotípicas e genotípicas para identificação e caracterização de seus perfis de resistência a antibióticos. O presente estudo mostrou que o leite cru de São José dos Pinhais/PR contém quantidades consideráveis de *S. aureus* e a maior frequência de resistência foi à penicilina o que pode indicar o uso indevido do antibiótico. Este estudo elucida questões importantes relativas à prática de ordenha em unidades familiares, de pequena e média produção leiteira, chamando atenção à necessidade da prevenção na disseminação da resistência bacteriana aos antibióticos no campo.

**Palavras-chave:** Antibiógrama. Contaminação do leite. Ordenhador. Propriedades leiteiras. *Staphylococcus aureus*.



## ABSTRACT

This dissertation was split into three chapters. Chapter 1 refers to a general introduction about milk, dairy activity, microbiological contamination, milk micro-organisms, good milking practices, and strains *Staphylococcus aureus* antimicrobial resistance. Chapter 2 refers to the study of the association of bacterial contamination milking with practices performed at milking. Rural properties were visited and socioeconomic profiles of milkers and microbiological aspects of the main contamination points were analyzed. We enumerated aerobic mesophiles (MA), total coliforms (TC), coagulase positive staphylococci (CPS) and researched *Salmonella* spp. Observed results described in this dissertation it was possible to correlate MA scores with CPS and MA with TC. It was also clear that the contamination of milking was influenced by knowledge, whether or not good practices, plant conditions, and production volume. Chapter 3 refers to *S. aureus* isolation from different samples of milking cow milking environment and its antibiotic resistance profile. Bacterial isolates were submitted to phenotypic and genotypic analyzes to identify and characterize their antibiotic resistance profiles. Thus, it was established that raw milk from the properties evaluated in São José dos Pinhais contains considerable amounts of *S. aureus* and a higher frequency of resistance to penicillin was observed, which may indicate the misuse of the antibiotic. This study elucidates important questions regarding the practice of milking in family units of small and medium milk production, drawing attention to need to prevent spread bacterial antimicrobial resistance in the field.

**Keywords:** Antibigram. Dairy properties. Milk contamination. Milker. *Staphylococcus aureus*.

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	CARACTERÍSTICAS DE PRODUÇÃO E SEUS VALORES MÉDIOS, MÍNIMOS E MÁXIMOS DAS 14 PROPRIEDADES LEITEIRAS DE SÃO JOSÉ DOS PINHAIS/PR.....	22
TABELA 2 -	CONTAGENS MÉDIAS, MÍNIMAS E MÁXIMAS DE AERÓBIOS MESÓFILOS, COLIFORMES TOTAIS E ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA DA ÁGUA, MÃOS, TETOS, EQUIPAMENTOS, UTENSÍLIOS E LEITE.....	25
TABELA 3 -	GENES PESQUISADOS, SEQUÊNCIAS DOS PRIMERS E CONDIÇÕES DAS REAÇÕES DE PCR UTILIZADAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE <i>S. aureus</i> E DEFINIÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS EM ISOLADOS DE <i>S. aureus</i> OBTIDOS NA ORDENHA DE PROPRIEDADES DE SÃO JOSÉ DOS PINHAIS/PR.....	42
TABELA 4 -	ANTIBIÓTICOS E AS CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE RESISTÊNCIA EM ISOLADOS DE <i>Staphylococcus aureus</i> PELA METODOLOGIA DISCO-DIFUSÃO. ...	43
TABELA 5 -	CONTAGENS MÍNIMAS E MÁXIMAS DE ECP NAS AMOSTRAS AVALIADAS DO LEITE E AMBIENTE DE ORDENHA.....	44
TABELA 6 -	NÚMERO DE ISOLADOS POSITIVOS PARA OS GENES DE IDENTIFICAÇÃO DO <i>Staphylococcus aureus</i> E DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS.....	44
TABELA 7 -	FREQUÊNCIA DE ISOLADOS SUSCETÍVEIS, INTERMEDIÁRIOS E RESISTENTES AOS ANTIBIÓTICOS TESTADOS. ....	46
TABELA 8 -	NÚMERO DE ISOLADOS DE <i>S. aureus</i> POSITIVOS PARA OS GENES DE RESISTÊNCIA E CLASSIFICAÇÃO EM SUSCETÍVEIS, INTERMEDIÁRIOS E RESISTENTES AOS ANTIBIÓTICOS TESTADOS OBTIDOS DE AMOSTRAS DO AMBIENTE DE ORDENHA DE PROPRIEDADES RURAIS DE SÃO JOSÉ DOS PINHAIS/PR.....	48



## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - FREQUÊNCIA RELATIVA DAS PRÁTICAS DE ORDENHA NAS PROPRIEDADES RURAIS ESTUDADAS DE SÃO JOSÉ DOS PINHAIS/PR.....	23
GRÁFICO 2 - CONTAGENS DE MICRO-ORGANISMOS AERÓBIOS MESÓFILOS, COLIFORMES TOTAIS E ESTAFILOCOCCOS COAGULASE POSITIVA PROVENIENTES DO AMBIENTE DE ORDENHA.....	27
GRÁFICO 3 - RELAÇÃO ENTRE MÃO DIREITA, MÃO ESQUERDA E TETOS. ....	28
GRÁFICO 4 - RELAÇÃO ENTRE AERÓBIOS MESÓFILOS E COLIFORMES TOTAIS DOS UTENSÍLIOS. ....	30
GRÁFICO 5 - RELAÇÃO ENTRE COLIFORMES TOTAIS DO LEITE E MÉDIA DE PRODUÇÃO DIÁRIA.....	31
GRÁFICO 6 - RELAÇÃO ENTRE AM E CT DO LEITE. ....	32
GRÁFICO 7 - MÉDIA DE AM DA ÁGUA, CT E ECP DO LEITE E ECP DA MÃO DIREITA NA PRESENÇA OU NÃO DE ÁGUA TRATADA.....	33
GRÁFICO 8 - MÉDIA DE AM DOS EQUIPAMENTOS PERTENCENTES A PRODUTORES COM ENSINO FUNDAMENTAL OU MÉDIO. ....	34
GRÁFICO 9 - MÉDIA DE CT DO LEITE E ECP DA MÃO DIREITA DE PROPRIEDADES COM TANQUE DE EXPANSÃO OU IMERSÃO. ...	35

## **LISTA DE QUADROS**

QUADRO 1 - CARACTERÍSTICAS DAS 14 PROPRIEDADES ESTUDADAS EM SÃO JOSÉ DOS PINHAIS/PR. ....	24
QUADRO 2 - FAIXAS DE CONTAGEM DE COLIFORMES TOTAIS NO LEITE E OS POSSÍVEIS FATORES DE CONTRIBUIÇÃO. ....	32

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM	–	Aeróbios mesófilos
APHA	–	<i>American Public Health Association</i>
ATCC	–	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	–	<i>Brain Heart Infusion</i>
CBT	–	Contagem bacteriana total
CT	–	Coliformes totais
ECP	–	Estafilococos coagulase positiva
IN	–	Instrução Normativa
LACQSA	–	Laboratório de Controle e Qualidade e Segurança de Alimentos
mod.	–	Modificado
MRSA	–	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
NMP	–	Número mais provável
PCR	–	Reação em cadeia da polimerase
ppm	–	partes por milhão
SEMAG	–	Secretaria Municipal de Agricultura e Abastecimento de São José dos Pinhais/PR
UFC	–	Unidades Formadoras de Colônias
UFPR	–	Universidade Federal do Paraná
UFV	–	Universidade Federal de Viçosa

## SUMÁRIO

<b>1 CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>12</b>
1.1 HIPÓTESES .....	16
1.2 OBJETIVOS .....	16
1.2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
<b>2 CAPÍTULO 2 - ARTIGO 1 - Influência das práticas de ordenha na qualidade bacteriana do leite .....</b>	<b>17</b>
2.1 INTRODUÇÃO .....	19
2.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	20
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	21
2.4 CONCLUSÃO .....	35
Agradecimentos .....	36
<b>3 CAPÍTULO 3 - ARTIGO 2 - Resistência a antibióticos em <i>Staphylococcus aureus</i> provenientes do leite, ordenhadores e ambiente de ordenha .....</b>	<b>37</b>
3.1 INTRODUÇÃO .....	38
3.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	39
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	43
3.4 CONCLUSÃO .....	49
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>49</b>
<b>APÊNDICE 1 - FORMULÁRIO PREENCHIDO DURANTE AS ENTREVISTAS REALIZADAS COM PRODUTORES DE LEITE DO MUNICÍPIO DE SÃO JOSÉ DOS PINHAIS, PR.....</b>	<b>60</b>
<b>ANEXO 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....</b>	<b>61</b>
<b>ANEXO 2 - APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS DA UFPR .....</b>	<b>64</b>
<b>ANEXO 3 - APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS .....</b>	<b>70</b>

## 1 CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO GERAL

### LEITE

O leite é um alimento fluido, nutricionalmente rico que contém quantidades consideráveis de proteínas, carboidratos, gorduras, vitaminas e sais, sendo de grande importância na alimentação humana (BELOTI, 2015; CORTEZ, 2017). As espécies bovina, caprina, ovina e bubalina se destacam na sua produção (CORTEZ, 2017). Além do consumo direto, o produto também é utilizado na elaboração de derivados de alta aceitação pelo consumidor (BIEGER; LOBO, 2010). Para atingir os padrões adequados de qualidade, é almejado que o leite apresente sabor aceitável, alto valor nutritivo, baixas contagens de células somáticas (CCS) e microbiana, além de ausência de patógenos e contaminantes (MARCONDES et al., 2017).

### ATIVIDADE LEITEIRA

Com uma produção de 33,5 bilhões de litros de leite (IBGE, 2017), o Brasil ocupa a terceira posição no ranking mundial, antecedido pelos Estados Unidos da América (EUA) e Índia (FAO, 2017; ZOCCAL; RENTERO, 2018).

No país, há um predomínio de pequenas e médias propriedades, tipicamente familiares, onde a principal fonte de renda é a atividade leiteira, principalmente, produtores com pequeno volume de leite, produzindo menos de 50 litros por dia, sendo em sua maioria somente para subsistência (MATSUBARA et al., 2011). A atividade leiteira é principalmente realizada em pequenas propriedades, mas os maiores volumes (e sólidos) são produzidos por um pequeno número de produtores (MARCONDES et al., 2017).

De acordo com Ribeiro Júnior et al. (2014) os maiores produtores têm obtido leite com melhor qualidade microbiológica. Ainda de acordo com Taffarel et al. (2013) o grau de tecnificação adotado nas propriedades leiteiras relaciona-se de forma direta à qualidade do leite. Assim, o leite produzido no Brasil tem sido visto como de baixa qualidade por estar associado ao grande número de pequenas propriedades e à falta de práticas de higiene (MARCONDES et al., 2017), o que pode resultar em penalidades e redução na renda dos produtores (NDAMBI et al., 2008).

## CONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA

Pelo fato do leite ser rico em nutrientes, possuir alta umidade e pH neutro (PARAFFIN; ZINDOVE; CHIMONYO, 2018), este favorece o crescimento e multiplicação de bactérias (BONFOH et al., 2003), representando um verdadeiro risco à saúde do consumidor. A possível contaminação do leite pode ser originária de diferentes fontes como os patógenos provenientes de animais, os quais podem ser bactérias da pele, teto ou glândula mamária e também do ambiente que poderão ser transferidos ao leite durante as etapas de coleta, manuseio, transporte, armazenamento, processamento e varejo (COOREVITS et al., 2008; CLAEYS et al., 2014; METZGER et al., 2018; PARAFFIN; ZINDOVE; CHIMONYO, 2018).

Em especial, a superfície dos tetos dos animais, os três primeiros jatos, as mãos do ordenhador, a superfície e a água residual de utensílios e equipamentos como latões, baldes e do tanque de expansão são considerados os principais pontos de contaminação no ambiente de ordenha (SILVA et al., 2011; BELOTI, 2015).

Embora possa ocorrer em várias etapas, a maior parte da contaminação é geralmente associada à propriedade rural. Por isso, é importante implementar medidas eficazes de controle de qualidade na propriedade (PARAFFIN; ZINDOVE; CHIMONYO, 2018).

## MICRO-ORGANISMOS DO LEITE

Os micro-organismos participam de toda a cadeia do leite, sejam eles desejáveis ou inconvenientes (VASCONCELLOS; ITO, 2011) e podem influenciar no sabor e textura dos derivados lácteos (QUIGLEY et al., 2013). Alguns dos principais micro-organismos encontrados no ambiente de ordenha são aeróbios mesófilos (AM), coliformes e estafilococos (BELOTI, 2015).

### Aeróbios Mesófilos

O melhor indicativo da qualidade microbiológica do leite é a contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos, que representarão a maior parte constituinte de sua microbiota, sendo muito utilizados para indicar a qualidade sanitária dos alimentos (NERO; DA CRUZ, 2017).



## Coliformes totais e termotolerantes

Os coliformes podem ser originários do ambiente, água, vegetais, equipamentos, sujidades e fontes fecais (KAGKLI et al., 2007). Podem fornecer indicação da presença de patógenos de origem entérica, no caso dos termotolerantes, além da deterioração do leite. Esses micro-organismos conseguem multiplicar-se rapidamente em ambientes úmidos com resíduos de leite em utensílios, tornando-se fontes estáveis de contaminação no ambiente de ordenha (NERO; DA CRUZ, 2017).

## Estafilococos coagulase positiva

Dentre os *Staphylococcus* coagulase positiva, o *Staphylococcus aureus* é uma das espécies mais importantes, sendo considerado um patógeno comensal e oportunista que pode causar um amplo espectro de infecções, desde cutâneas superficiais a doenças invasivas graves e potencialmente fatais (LOWY, 1998). O *S. aureus* pode atingir o interior das glândulas mamárias por meio da superfície externa da pele e do úbere mal higienizado, equipamentos e utensílios de ordenha contaminados (FEHLHABER; JANESTSCHKE, 1995) e mãos dos ordenhadores (FONTANA et al., 2012).

## *Salmonella* spp.

A salmonela não faz parte do grupo de micro-organismos indicadores, porém, é a principal causa de doenças transmitidas por alimentos, representando taxas até mais elevadas de morbidade e mortalidade entre os patógenos transmitidos pelos alimentos. As infecções por *Salmonella* spp. resultam em altos custos econômicos e sociais e o controle eficiente desse micro-organismo na produção de alimentos é uma tarefa difícil. Há mais de 2.600 sorovares (ISSENHUTH-JEANJEAN et al., 2014) originários de diferentes reservatórios, isso torna necessário o desenvolvimento de estratégias de intervenção que abordem cada via de contaminação, sorotipos e alimentos, tornando o controle da *Salmonella* spp., um desafio (SANT'ANA, 2012).

## BOAS PRÁTICAS NA ORDENHA

A melhoria da qualidade do leite pode ser alcançada com boa alimentação oferecida aos animais, bom saneamento ambiental e com as boas práticas de ordenha (SURANINDYAH et al., 2015), e em conjunto com a manutenção, higienização dos equipamentos e o monitoramento da sanidade da glândula mamária, podem reduzir a contagem bacteriana total (CBT) e a CCS do leite (BOZO et al., 2013).

O pagamento por qualidade do leite, como medida de incentivo aos produtores a realizarem as práticas de higiene nas propriedades, também contribui para a melhoria do leite cru brasileiro (RIBEIRO JÚNIOR et al., 2014). Além de melhorar a qualidade do leite, as atitudes e o comportamento do produtor são responsáveis para controlar a mastite bovina por meio das práticas de manejo (JANSEN et al., 2009).

## RESISTÊNCIA DE CEPAS DE ESTAFILOCOCOS AOS ANTIBIÓTICOS

Em ruminantes, *S. aureus* é um dos principais agentes causadores de mastite bovina, uma das razões para o uso de antibióticos em fazendas (HARAN et al., 2012). É um agente patogênico versátil em termos de infecções e hospedeiros, tornando-se uma séria ameaça à saúde animal e humana (PETON; LE LOIR, 2014), produz toxinas que estão relacionadas à resistência aos antibióticos e à severidade dos sintomas das infecções intramamárias (FAGUNDES; OLIVEIRA, 2004). O uso de agentes antibióticos em propriedades leiteiras leva ao surgimento de cepas resistentes, tornando-se necessária uma monitorização em ambientes leiteiros, pois envolve seres humanos, animais e o ambiente de produção (HARAN et al., 2012).

## 1.1 HIPÓTESES

Ordenhadores que realizam as boas práticas de ordenha (lavagem adequada de mãos, descarte dos três primeiros jatos em caneca telada, fundo escuro ou material similar, realização de pré e pós-*dipping*, uso de papel toalha substituindo o pano, alimentação das vacas após ordenha, higienização dos equipamentos e utensílios e secagem de equipamentos e utensílios de forma invertida) possuem leite de melhor qualidade microbiológica.

O leite gerado em unidades de menor produção tem uma CBT maior.

Maior nível de escolaridade e o ambiente de ordenha contendo instalações adequadas (teto, piso, água tratada, torneira, pia, iluminação, tanque de expansão) resultam em um leite menos contaminado.

A mão direita dos ordenhadores é mais contaminada do que a esquerda.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 OBJETIVO GERAL

Conhecer o perfil socioeconômico dos produtores de leite no município de São José dos Pinhais/PR e as relações das práticas de ordenha com a contaminação bacteriana do leite em propriedades leiteiras.

### 1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar visitas às propriedades rurais que geram leite no município de São José dos Pinhais;

Entrevistar os produtores de leite visitados;

Realizar a pesquisa e enumeração de bactérias em amostras de água, mãos dos ordenhadores, tetos das vacas, equipamentos, utensílios e leite cru;

Relacionar os achados das entrevistas com os resultados das análises microbiológicas;

No caso de encontrar cepas de *Staphylococcus aureus*, obter o seu perfil de resistência aos antibióticos.

## 2 CAPÍTULO 2 - ARTIGO 1 - Influência das práticas de ordenha na qualidade bacteriana do leite

### Influence of milking practices on bacterial milk quality

Luany Yone Miyoshi<sup>1</sup>, Suzana Maria Rocha<sup>2</sup>, Delane Ribas da Rosa<sup>3</sup>, Julia Arantes Galvão<sup>4\*</sup>

#### RESUMO

A baixa qualidade microbiológica do leite está relacionada a fatores multivariados, sendo assim, o objetivo deste trabalho foi verificar se havia a associação da contaminação bacteriana presente na ordenha com as práticas executadas para a obtenção do leite, instalações e com o perfil socioeconômico de ordenhadores. Para isso foi utilizado um universo amostral de 14 propriedades rurais que foram caracterizadas quanto ao perfil socioeconômico dos ordenhadores e perfil microbiológico dos principais pontos de contaminação na ordenha. Foram enumerados aeróbios mesófilos (AM), coliformes totais (CT), estafilococos coagulase positiva (ECP) e pesquisada a *Salmonella* spp. Em média, os produtores tinham 47 anos, 24 deles dedicados à leiteira. O número médio de vacas em lactação/propriedade foi de 15 animais, produzindo 234 litros/dia (14 L/vaca/dia). Eram realizadas duas ordenhas/dia por 93% dos produtores e três ordenhas/dia por 7% deles. O sistema mecânico do tipo “balde ao pé”, canalizada e manual era praticado por 71%, 21% e 7% dos produtores, respectivamente. Das 14 propriedades, 86% não possuíam água tratada. A água encanada, pia e/ou torneira estavam presentes em 93% das propriedades e o piso em 86% das instalações. Todas apresentavam teto e iluminação elétrica no local de ordenha. Para higienização de equipamentos e utensílios foram citados diversos produtos pelos ordenhadores. Com relação às boas práticas de ordenha, 79% dos produtores lavavam as mãos antes da ordenha, 50% desprezavam os três primeiros jatos de leite, 7% utilizava o bezerro ao pé, 71% lavavam os tetos das vacas, 64% usavam papel toalha descartável, 29% usavam panos, 79% não realizavam pré e pós-*dipping*, 43% alimentavam as vacas após a ordenha. Todos os produtores refrigeravam o leite após a ordenha (tanque de expansão: 79% e de imersão: 21%) e higienizavam os utensílios e equipamentos, que eram secos de forma invertida (93%). As contagens ( $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> ou mL) médias de AM foram: 3,29 na água; 2,15 na mão direita; 1,93 na mão esquerda; 3,87 nos tetos; 3,40 nos equipamentos; 2,91 nos utensílios e 4,79 no leite. As contagens médias de CT foram: 0,39 na água; 0,12 na mão direita, 0,09 na mão esquerda; 0,49 nos tetos;

<sup>1</sup> Discente de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – Universidade Federal do Paraná (UFPR). Rua dos Funcionários, 1540, Juvevê, CEP 80035-060, Curitiba, PR, Brasil. Tel. (41) 3350-5811. E-mail: luanymiyoshi@gmail.com.

<sup>2</sup> Discente do Curso de Medicina Veterinária - UFPR/Curitiba, PR, Brasil. E-mail: suzana.rocha@ufpr.br.

<sup>3</sup> Discente do Curso de Zootecnia – UFPR/Curitiba, PR, Brasil. E-mail: delane.rdr@gmail.com.

<sup>4</sup> Professora do Departamento de Medicina Veterinária – UFPR/Curitiba, PR, Brasil. E-mail: juliaarantesgalvao@gmail.com.

\* Autor para correspondência.

1,08 nos equipamentos, 0,51 nos utensílios e 2,68 no leite. Os ECP não foram detectados na água, mas ocorreram na mão direita (0,66); mão esquerda (0,40); tetos (0,47); equipamentos (0,16); utensílios (0,02) e leite (2,79). Não foi detectada *Salmonella* spp. em nenhuma amostra. Com os resultados encontrados foi possível inferir que a contaminação da ordenha foi influenciada pelo conhecimento, realização ou não das boas práticas, condições das instalações e volume de produção.

**Palavras-chave:** Higiene. Manipulação de ordenha. Micro-organismos. Produção de leite.

## ABSTRACT

The microbiological quality of milk is related to several factors, thus, the aim of this study was to verify the association of bacterial contamination present in milking with the practices performed to obtain milk, facilities and the socioeconomic profile of milkers. For this study, were used samples of 14 rural properties, characterized by the socioeconomic profile of the milkers and the microbiological profile of the main contamination points at milking. Were counted aerobic mesophiles (MA), total coliforms (TC), coagulase positive staphylococci (CPS) and *Salmonella* spp. On average, the producers had 47 years, 24 of them were dedicated only to the dairy. The mean number of lactating cows was 15 animals, producing 234 L/day (14 L/cow/day). Were performed two milking/day by 93% of the producers and three milking/day by 7% of them. The mechanical system of the "milking buckets" type, channeled and the manual was practiced by 71%, 21% and 7% of the producers, respectively. 86% of properties had no potable water, 93% had piped water and sink and the floor was present in 86% of facilities. All properties presented ceiling and electric lighting in the milking room. For equipment and utensils hygiene were mentioned several products by milkers. With regard to good milking practices, 79% of farmers did wash their hands before milking, 50% discard the first three jets of milk, 7% used the "calf at the foot", 71% washed the cows' teats, 64% used paper towels 29% used cleaning cloths, 79% did not perform the pre- and post-dipping, 43% fed the cows after milking. All producers refrigerated the milk after milking (expansion tank: 79% and immersion tank: 21%) and sanitized the equipment and drying the equipment inverted. The mean MA counts ( $\log_{10}$  CFU/cm<sup>2</sup> or mL) were: 3.29 in water; 2,15 on the right hand; 1,93 on the left hand; 3.87 on teats; 3.40 in equipment; 2.91 in utensils and 4.79 in milk. Mean TC counts were: 0.39 in water; 0.12 on the right hand, 0.09 on the left hand; 0.49 on teats; 1.08 in the equipment, 0.51 in the utensils and 2.68 in the milk. CPS were not detected in water, but occurred on the right hand (0.66); left hand (0.40); teats (0.47); equipment (0.16); utensils (0.02) and milk (2.79). The presence of *Salmonella* spp. was not detected in any sample. Thus, according to these results, it was possible to infer that the contamination of the milking was influenced by the knowledge, the implementation of good practices, the situation of the milking facilities and milk production volume.

**Keywords:** Dairy production. Hygiene. Microorganisms. Milking handling.

## 2.1 INTRODUÇÃO

A atividade leiteira impulsiona a economia no Brasil (BIEGER; LOBO, 2010), destacando-se na geração de empregos diretos e indiretos em toda a cadeia de produção (PEROBELLI; ARAÚJO JUNIOR; CASTRO, 2018), sendo uma das poucas atividades rurais que gera renda mensal, contribuindo para a diminuição do êxodo rural e fixando o homem no campo (ZOCCAL, 2017). Considerado um alimento rico, composto por diversas substâncias com importância nutricional, o leite, além de consumido *in natura*, é também utilizado na elaboração de derivados lácteos de alta aceitação pelo consumidor (CORTEZ, 2017).

De 2006 a 2017 a produção leiteira do Brasil teve um aumento de 46% a nível nacional e de 35% no estado do Paraná (IBGE, 2017). Assim, o país ocupou a terceira posição no ranking mundial, antecedido pelos Estados Unidos da América (EUA) e Índia (FAO, 2017), gerando 33,5 bilhões de litros de leite (IBGE, 2017) e o Paraná é o terceiro estado no ranking nacional com uma produção de 4,4 bilhões de litros de leite, sendo Minas Gerais e Rio Grande do Sul, os estados ranqueados à sua frente. O volume de leite cru adquirido pelos estabelecimentos sob inspeção federal no terceiro trimestre de 2018 foi de 6,24 bilhões de litros. Nesse mesmo trimestre, o estado do Paraná contribuiu com 13% da aquisição nacional, cerca de 820 milhões de litros (IBGE, 2018).

A produção leiteira brasileira se distribui em vários níveis organizacionais e tecnológicos, que vão desde a agricultura familiar, pequenas cooperativas a propriedades com elevado nível tecnológico (WILLERS et al., 2014). Para que o Brasil possa se tornar mais competitivo nesse cenário, é necessário, entre outros aspectos, que produtores e técnicos ligados à cadeia produtiva busquem melhorar o processo de obtenção do leite, aprimorando a qualidade do produto e a segurança do alimento fornecido (WERNCKE et al., 2016).

A baixa qualidade microbiológica do produto nacional é relatada em diversos estudos, relacionada à falhas nos procedimentos de resfriamento, armazenamento, transporte do leite e principalmente à falta de higiene na ordenha (NERO et al., 2005; BELOTI et al., 2012; RIBEIRO JÚNIOR et al., 2014). Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi verificar a associação da contaminação bacteriana presente na ordenha com as práticas executadas para a obtenção do leite, instalações e com o perfil socioeconômico de cada ordenhador.



## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no período de maio de 2017 a setembro de 2018. A partir do contato com a Secretaria de Agricultura e Abastecimento do município de São José dos Pinhais (SEMAG), Paraná, foi constatado o cadastramento de 42 propriedades leiteiras, destas, 25 foram indicadas pelos técnicos para participação no estudo, considerando o interesse de cada produtor, na melhoria do produto e permanência na atividade. Foi elaborado um questionário contendo 29 itens, com base na literatura (GUERREIRO et al., 2005; RANGEL; PALLARES; CASTRO, 2008; BIEGER; LOBO, 2010; MATSUBARA et al., 2011; SILVA et al., 2011; BATTAGLINI et al., 2013; PAIXÃO et al., 2014; WERNCKE et al., 2016) para traçar o perfil produtivo e dos trabalhadores abrangendo questões socioeconômicas, estrutura disponível para ordenha, produção e práticas de ordenha (Apêndice 1) de cada propriedade.

Foi realizado o contato via telefone e visitas às propriedades com o acompanhamento das entrevistas pelos técnicos da Secretaria, bem como das coletas de amostras nas propriedades. As entrevistas e coletas de amostras ocorreram mediante a assinatura do termo de consentimento (Anexo 1) fornecido pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos da Universidade Federal do Paraná.

Além disso, a partir da literatura consultada foram elencados os principais pontos de contaminação microbiológica na ordenha: água utilizada na ordenha, mãos do ordenhador, tetos dos animais, equipamentos, utensílios e o leite cru (SANTANA et al., 2001; YAMAZI et al., 2010; MATSUBARA et al., 2011; SILVA et al., 2011), os quais foram utilizados para a caracterização do perfil microbiológico por meio da enumeração de micro-organismos aeróbios mesófilos (AM), coliformes totais (CT), estafilococos coagulase positiva (ECP) e pesquisa de *Salmonella* spp.

Na coleta de amostras de água e leite foram utilizadas embalagens estéreis (Labplas Twirl'EM®). As amostras das mãos do ordenhador, tetos dos animais, equipamentos e utensílios foram coletadas utilizando *swabs* (Absorve®) previamente hidratados em solução salina 0,85%. Para delimitar as áreas amostradas, foram utilizados moldes flexíveis de polietileno esterilizados de 3 cm<sup>2</sup> para teteiras e tetos (SANTANA et al., 2001; YAMAZI et al., 2010; SILVA et al., 2011), 100 cm<sup>2</sup> para baldes, latões e coadores (SANTANA et al., 2001; MATSUBARA et al., 2011) e 50 cm<sup>2</sup> para as mãos do ordenhador. Os moldes foram confeccionados pela equipe do Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança de Alimentos (LACQSA-UFPR). Após a

realização da amostragem, os *swabs* foram armazenados em tubos contendo 10 mL de solução salina 0,85%. As amostras foram transportadas em caixas isotérmicas até o LACQSA, onde foram processadas.

As análises de AM e ECP foram executadas de acordo com as recomendações da Instrução Normativa 62 (BRASIL, 2003), para CT foram seguidas as instruções dos fabricantes do Petrifilm™ CC (3M™ Petrifilm™) e para salmonela foi utilizada a metodologia descrita no *Bacteriological Analytical Manual* (ANDREWS; HAMMACK, 2007).

Foram realizadas estatísticas descritivas e análises de correlação entre as contagens microbiológicas e as respostas dos questionários. Foi realizada a avaliação pelo coeficiente de correlação de Spearman, teste U de Mann-Withney e Kruskal-Wallis. Todos os testes foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ . Todas as análises foram realizadas no programa SPSS 20.0.

## 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 25 propriedades indicadas pela Secretaria de Agricultura, 14 participaram da pesquisa, conforme disponibilidade e interesse de cada produtor.

### 2.3.1 Respostas aos questionários

O mais jovem dos produtores incluídos neste estudo tinha 31 anos e o mais velho, 62 anos. A idade média relatada foi 47 anos (Quadro 1), equivalente a maior representatividade (62%) dos produtores do Paraná, com idades de 30 a 60 anos (IBGE, 2017). Em unidades de produção leiteira no Rio Grande do Sul, Picoli et al. (2015) encontraram uma média de 49 anos, coincidindo com a média da faixa etária deste trabalho.

O tempo médio de vida dedicado à atividade leiteira foi de 24 anos dentre os entrevistados, sendo que o produtor mais antigo já atuava na atividade há 44 anos e o mais recente há 5 meses, tempo superior ao encontrado por Múnera-Bedoya et al. (2017), em que os ordenhadores trabalhavam há 4 anos e meio na atividade. Neste estudo, com exceção de um funcionário, todos os trabalhadores residiam na propriedade rural e a mão de obra era familiar. Quanto à escolaridade dos produtores, 9 (64%) concluíram o ensino fundamental e cinco (36%), o ensino médio (Quadro 1).

Considerando os valores médios, encontrados neste estudo, relativos à produtividade dos animais (Tabela 1) e os apontamento de Bieger e Lobo (2010), duas (14%) propriedades podem ser consideradas pequenas (até 50 L/dia), 9 (64%) delas são médias (51 a 250 L/dia) e três (21%) delas são grandes propriedades (acima de 250 L/dia).

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS DE PRODUÇÃO E SEUS VALORES MÉDIOS, MÍNIMOS E MÁXIMOS DAS 14 PROPRIEDADES LEITEIRAS DE SÃO JOSÉ DOS PINHAIS/PR.

<b>Características</b>	<b>Média</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
Vacas em lactação	15	4	35
Produção diária (L)	234	20	800
Produtividade/vaca (L)	14	2	30

Dos entrevistados, 12 (86%) não utilizavam água tratada. Em uma (7%) propriedade não havia água encanada, pia e/ou torneira no local de ordenha, sendo que a água era transportada em baldes diretamente da casa do produtor. Duas (14%) propriedades não possuíam piso. Todas as propriedades possuíam teto e iluminação elétrica (Quadro 1). O ambiente de ordenha e as condições gerais das edificações (área coberta, piso, paredes ou equivalentes) da maioria das propriedades estudadas não eram compatíveis à prevenção de contaminações (BRASIL, 2011).

Com relação aos detergentes/sanitizantes utilizados para a higienização dos utensílios e equipamentos, várias respostas foram citadas como “água quente, água fria, água sanitária, hidróxido de sódio, detergente alcalino, detergente ácido, produtos domésticos, detergente normal e sabão químico”. Somente dois (14%) produtores utilizavam água quente e os detergentes alcalino e ácido, considerados o recomendado (VENDRAMINI, 2017).

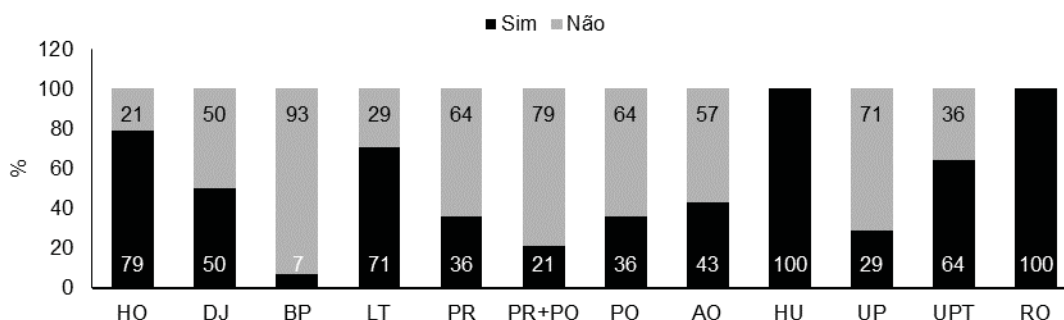
A utilização desses produtos específicos juntamente com os procedimentos adequados de higienização do equipamento de ordenha e do tanque de armazenamento do leite, estão associados às contagens bacterianas de até 100.000 UFC/mL no leite. As contagens acima de 500.000 UFC/mL estavam associadas ao uso de apenas um ou nenhum desses produtos na higienização (ARCURI et al., 2006).

Dos entrevistados, somente um (7%) produtor realizava três ordenhas por dia, os demais (93%) realizavam duas ordenhas ao dia, 10 (71%) propriedades possuíam ordenha mecânica do tipo “balde ao pé”, três (21%) trabalhavam com ordenha mecânica canalizada e um (7%) realizava a ordenha manual (Quadro 1).

As práticas de manejo recomendadas eram seguidas parcialmente e de forma muito variável dentre os ordenhadores. Os problemas observados neste estudo foram:

não higienização das mãos do ordenhador, não realização: do teste de caneca de fundo preto, do pré e pós-*dipping*, primeiros jatos de leite desprezados no chão, prática do pré-*dipping* realizada com água e uso de pano coletivo (Gráfico 1).

GRÁFICO 1 - FREQUÊNCIA RELATIVA DAS PRÁTICAS DE ORDENHA NAS PROPRIEDADES RURAIS ESTUDADAS DE SÃO JOSÉ DOS PINHAIS/PR.



LEGENDA: HO: Higienização do ordenhador, DJ: Descarte dos primeiros jatos, BP: Bezerro ao pé, LT: Lavagem dos tetos, PR: Pré-*dipping*, PR+PO: Pré + pós-*dipping*, PO: Pós-*dipping*; AO: Alimentação após ordenha, HU: Higienização dos utensílios, UP: Uso de panos, UPT: Uso de papel toalha, RO: Refrigeração após ordenha.

A utilização de práticas simples como desprezo dos três primeiros jatos de leite, lavagem dos utensílios de ordenha com detergente alcalino clorado 2%, pré-*dipping* com solução clorada 750 ppm em caneca sem refluxo e eliminação da água residual dos utensílios de ordenha, como recomendaram Vallin et al. (2009), podem contribuir significativamente para a melhoria da qualidade do leite.

Após a higienização dos utensílios e teteiras, 13 (93%) produtores afirmaram deixá-los secando de forma invertida e um (7%) afirmou deixar secar sem inverter e ao natural. Em relação às formas de resfriamento do leite, 11 (79%) ordenhadores usavam o tanque de expansão e três (21%) resfriavam o leite em tanque de imersão, mantendo-o em latões (Quadro 1). Após a ordenha é necessário armazenar o leite até o momento de sua coleta. O local de armazenagem precisa ser refrigerado para manter as características do leite, sem perder qualidade. Geralmente, são utilizados equipamentos de refrigeração, desde um equipamento comum, como o *freezer*, ou um refrigerador próprio, como o resfriador por imersão ou por expansão (BIEGER; LOBO, 2010).

QUADRO 1 - CARACTERÍSTICAS DAS 14 PROPRIEDADES ESTUDADAS EM SÃO JOSÉ DOS PINHAIS/PR.

ITENS QUESTIONADOS	PROPRIEDADES													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Mão de obra	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM	CONTR	FAM	FAM	FAM
Tempo na atividade (anos)	20	30	35	8	20	30	7	43	44	20	5 M	30	10	18
Reside na propriedade	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	N	S	S	S
Idade	41	49	55	31	33	56	42	62	52	56	40	37	42	57
Escolaridade	MED	FUND	MED	MED	MED	FUND	FUND	FUND	FUND	FUND	FUND	FUND	MED	FUND
Média de produção diária	155	200	70	200	260	160	150	60	180	800	50	20	800	170
Média de produção animal	16	20	7	14	17	30	10	12	10	22	2	5	26,6	11,3
Tipo de ordenha	MEC BP	MEC BP	MEC BP	MEC BP	MEC BP	MEC CAN	MEC BP	MEC BP	MEC BP	MEC BP	MEC CAN	MANUAL	MEC CAN	MEC BP
Nº de ordenhas diárias	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Higienização do ordenhador	N	N	S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	S	N
Higienização dos utensílios	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Secagem dos utensílios/teteiras	INV	INV	INV	NAT	INV	INV	INV	INV	INV	INV	INV	INV	INV	INV
Descarte dos primeiros jatos	N	S	S	N	N	S	S	S	N	S	N	N	S	N
Fundo escuro	NA	N	N	NA	NA	N	S	N	NA	N	NA	NA	N	NA
Lava o teto dos animais	S	S	S	S	N	N	S	S	S	S	N	S	N	S
Uso de panos reutilizáveis	N	N	N	S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	S
Uso de papel toalha	S	S	N	N	N	S	S	S	S	N	S	S	S	N
Pré-dipping	S	N	N	N	N	S	S	N	N	N	S	N	S	N
Pós-dipping	N	S	S	N	N	S	S	N	N	N	N	N	S	N
Alimentação após ordenha	S	S	S	S	S	N	S	N	N	N	N	N	N	N
Refrigeração do leite após ordenha	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Tratamento de água	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	S	N	N
Água encanada	S	S	N	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Pia/torneira	S	S	N	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Teto	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Iluminação	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Piso	N	S	S	N	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Tipo de tanque	IM	EXP	IM	EXP	EXP	EXP	EXP	EXP	EXP	EXP	EXP	IM	EXP	EXP

LEGENDA: CONTR: contratada, EXP: expansão, FAM: familiar, FUND: fundamental, IM: imersão, INV: invertido, M: meses, MEC BP: mecânica balde ao pé, MEC CAN: mecânica canalizada, MED: médio, N: não, NA: não se aplica (jatos descartados no chão), NAT: natural, S: sim.

### 2.3.2 Análises microbiológicas

Os resultados das análises microbiológicas de AM, CT e ECP realizadas na água, mãos, tetos, equipamentos, utensílios e leite foram convertidos em  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> ou  $\log_{10}$  UFC/mL. Não foi detectada *Salmonella* spp. em nenhuma das 140 amostras avaliadas. Os valores encontrados estão descritos na tabela 2.

TABELA 2 - CONTAGENS MÉDIAS, MÍNIMAS E MÁXIMAS DE AERÓBIOS MESÓFILOS, COLIFORMES TOTAIS E ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA DA ÁGUA, MÃOS, TETOS, EQUIPAMENTOS, UTENSÍLIOS E LEITE.

AMOSTRA	AERÓBIOS MESÓFILOS			COLIFORMES TOTAIS			ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA		
	Média	Mín.	Máx.	Média	Mín.	Máx.	Média	Mín.	Máx.
Água*	3,29	1,85	5,12	0,39	0	2,04	0	0	0
Mão direita	2,15	0	3,92	0,12	0	0,83	0,66	0	1,98
Mão esquerda	1,93	1,38	2,44	0,09	0	0,68	0,4	0	2,53
Tetos	3,87	2,56	6,00	0,49	0	2,83	0,47	0	4,82
Equipamentos	3,40	0	5,86	1,08	0	3,78	0,16	0	2,19
Utensílios	2,91	0,88	4,74	0,51	0	3,26	0,02	0	0,3
Leite	4,79	3,84	5,85	2,68	1,2	3,62	2,79	0	4,92

NOTA: \*Nas amostras de água tratada (P3 e P12) as contagens observadas foram de 5,12 e 4,25  $\log_{10}$  UFC/mL, respectivamente, e nas amostras de água de poço (P1, P2, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P13 e P14) foram de 1,85 a 4,54  $\log_{10}$  UFC/mL.

#### 2.3.2.1 Água

No Brasil não existe uma especificação para a qualidade da água de poço. Para água tratada na saída do tratamento, a regulamentação disponível é a Portaria de Consolidação nº 5 que estabelece parâmetros físico-químicos e microbiológicos. Nela é recomendada a enumeração de micro-organismos indicadores (mesófilos, coliformes totais). A primeira análise a ser realizada é a enumeração de coliformes totais e, caso sejam detectados, o parâmetro de micro-organismos mesófilos é utilizado, com a tolerância de até 500 UFC/mL (2,70  $\log_{10}$  UFC/mL) (BRASIL, 2017).

A Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas para Alimentos (ICMSF, 2015) também classifica como imprópria a água de processo de alimentos que contenha coliformes totais.

A água de 6 (43%) localidades (P1, P4, P5, P6, P13 e P14) foi considerada imprópria, devido à presença de coliformes totais e quatro (67%) dessas apresentaram  $\geq 500$  UFC/mL (2,70  $\log_{10}$  UFC/mL) de micro-organismos mesófilos. Outros autores encontraram contagens de indicadores ainda mais preocupantes do que as observadas neste estudo. Daneluz e Tessaro (2015) relataram coliformes



totais em 75% (45) das amostras de água de poços rasos de propriedades rurais em Toledo/PR e ainda, Bortoli et al. (2017) que constataram a presença de coliformes totais em 100% (10) das amostras de água de poços próprios em Encantado/RS.

Em 8 (57%) propriedades (P2, P3, P7, P8, P9, P10, P11 e P12), a água estava de acordo com o padrão exigido para ausência de coliformes totais, porém, 5 dessas propriedades estavam acima da recomendação de 500 UFC/mL ( $2,70 \log_{10}$  UFC/mL) para mesófilos (Gráfico 2).

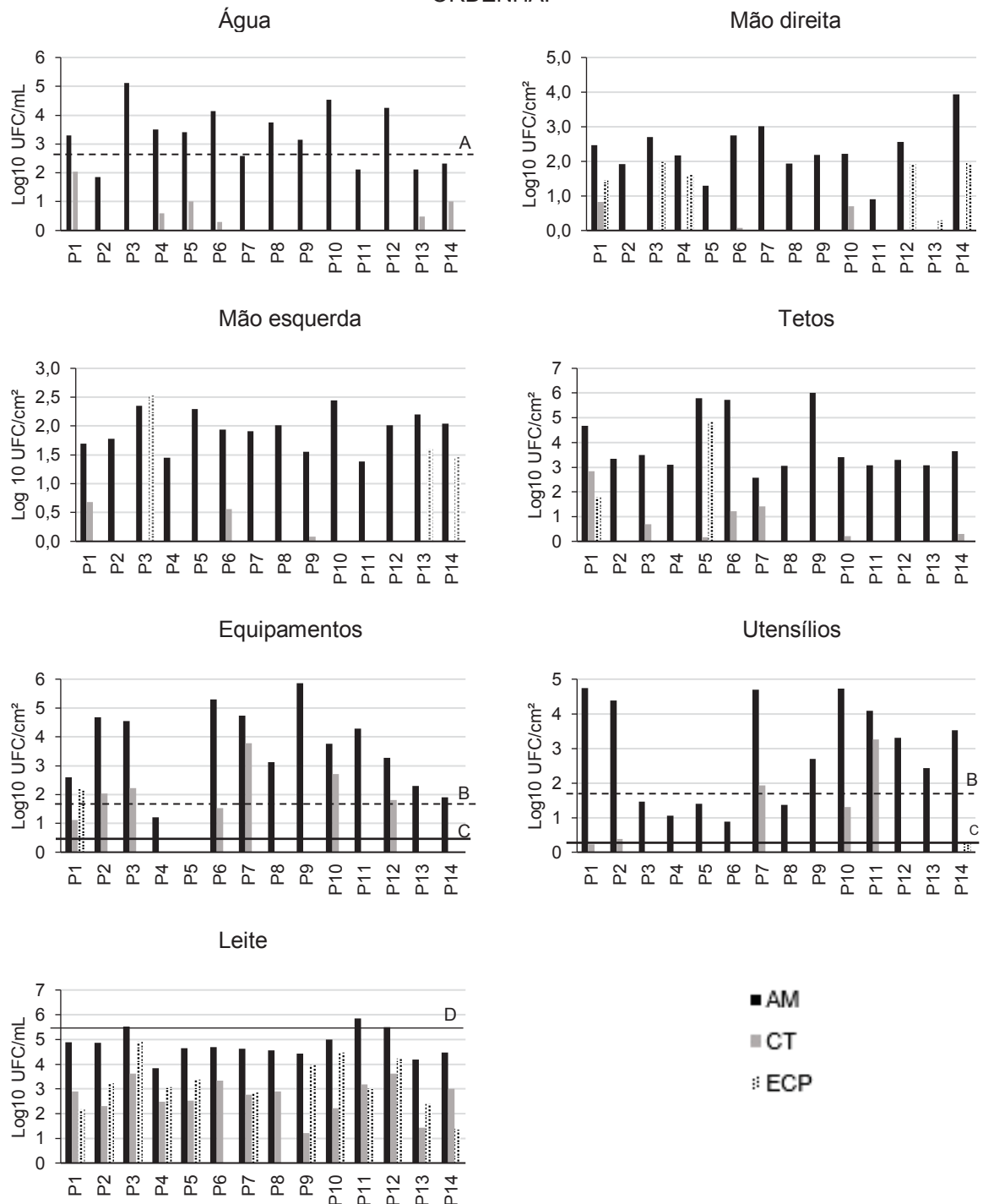
A falta das práticas de higiene durante a coleta e armazenamento leva à contaminação da água após o fornecimento, para isso, quem manuseia a água deve ser instruído sobre o risco de contaminação pós-coleta (AMENU; SHITU; ABERA, 2016).

#### 2.3.2.2 Mãos dos ordenhadores

Em relação às mãos de manipuladores, não há padrões ou especificações para contagens microbiológicas. Nesse caso, foi considerada a recomendação de Tondo e Bartz (2011) que é a ausência de coliformes termotolerantes ou *E. coli* nas mãos. No presente estudo, observou-se a presença de CT nas mãos de quatro (28%) produtores (Gráfico 2), porém, não podemos dizer se eram coliformes termotolerantes ou *E. coli*, de acordo com a metodologia utilizada neste trabalho.

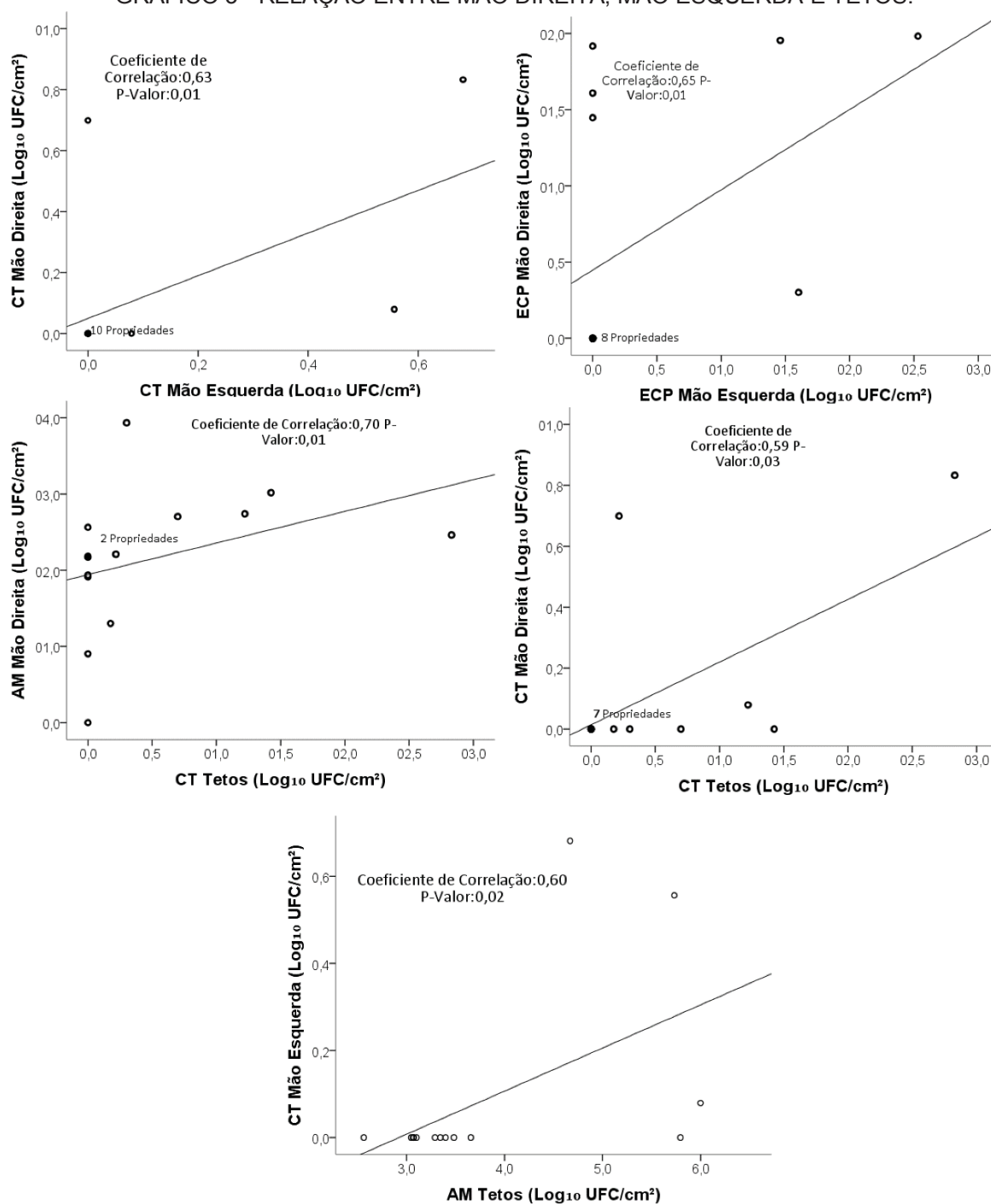
A mão direita continha uma maior quantidade dos micro-organismos analisados do que a mão esquerda (Tabela 2), confirmando uma das hipóteses em questão. As contagens médias ( $2,04 \log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> de AM,  $0,10 \log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> de CT e  $0,53 \log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> de ECP) foram inferiores às médias encontradas nas mãos dos ordenhadores em propriedades leiteiras do agreste Pernambucano ( $5,38 \log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> de AM,  $3,98 \log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> de CT e  $2,94 \log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> de ECP) (SILVA et al., 2011). Foi observada uma correlação positiva nas contagens de micro-organismos entre a mão direita e esquerda e entre mãos e tetos, confirmando outra hipótese de que a não higienização das mãos contribui para a contaminação da ordenha (Gráfico 3).

GRÁFICO 2 - CONTAGENS DE MICRO-ORGANISMOS AERÓBIOS MESÓFILOS, COLIFORMES TOTAIS E ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA PROVENIENTES DO AMBIENTE DE ORDENHA.



LEGENDA: A: Limite de tolerância (LT): 2,70  $\log_{10}$  UFC/mL (BRASIL, 2017), B: LT: 1,70  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> (SILVA JR, 2014), C: LT: 0,30  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> (APHA, 1992) e D: LT: 5,48  $\log_{10}$  UFC/mL (BRASIL, 2011).

GRÁFICO 3 - RELAÇÃO ENTRE MÃO DIREITA, MÃO ESQUERDA E TETOS.



LEGENDA: AM: aeróbios mesófilos, CT: coliformes totais, ECP: estafilococos coagulase positiva, ●: mais de uma propriedade, ○: 1 propriedade.

As mãos são consideradas um importante ponto de contaminação do leite (SILVA et al., 2011), são os veículos que mais geram contaminação quando não são higienizadas corretamente, podendo carrear micro-organismos de uma mão para a outra, para os tetos dos animais e equipamentos de ordenha.

### 2.3.2.3 Superfície do teto

A contagem média de AM nos tetos foi de  $3,87 \log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup>, resultado inferior ao encontrado por Pimentel (2016) nos tetos de búfalas do Distrito Federal ( $5,20 \log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup>). Matsubara et al. (2011) também obteve resultados superiores ( $4,00 \log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup>) ao deste trabalho, os autores afirmam que a desinfecção dos tetos antes da ordenha com solução clorada a 750 ppm ocasionou a redução de 87,3% de AM, 91,3% de coliformes totais e 85,3% de ECP.

Observou-se a presença de CT ( $0,49 \log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup>) nos tetos das vacas de 7 (50%) propriedades. Os ECP estavam presentes na superfície dos tetos das vacas de duas (14%) propriedades, na P1 com  $1,79 \log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> (com pré-*dipping*) e P5 com  $4,82 \log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> (sem pré-*dipping*). É sabido que a prática do pré-*dipping* pode reduzir a contaminação bacteriana dos tetos em aproximadamente 90% (BRITO; BRITO; VERNEQUE, 2000). Ainda, Miguel et al. (2012) concluíram que o pré-*dipping* é uma importante ferramenta para reduzir a contaminação da pele dos tetos, ficando evidente o potencial risco à contaminação do leite quando não praticado.

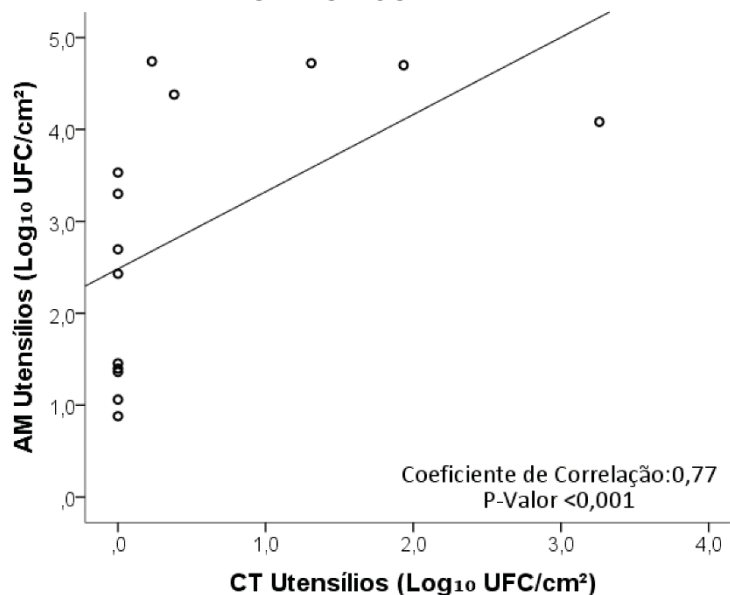
### 2.3.2.4 Equipamentos (teteiras, parede do latão de resfriamento) e utensílios (baldes, latões e coadores)

Não há uma legislação específica no Brasil que estabeleça padrões aceitáveis para contagem de micro-organismos nas superfícies de equipamentos e utensílios utilizados na ordenha do leite. Considerando superfícies que tenham contato com alimentos, existem duas recomendações, uma delas internacional, a *American Public Health Association* – APHA que limita em até 2 UFC/cm<sup>2</sup> ( $0,30 \log_{10}$ ) de aeróbios mesófilos (SVEUM et al., 1992) e a outra é o “Manual de controle higiênico sanitário em serviço de alimentação” publicado por Silva Jr. (2014) que indica o limite de 50 UFC/cm<sup>2</sup> ( $1,70 \log_{10}$ ). Assim, apenas os equipamentos de uma (7%) propriedade (P5) estavam de acordo o limite estabelecido pela APHA. Já se considerarmos a recomendação de Silva Jr., os equipamentos de duas (P4 e P5) e utensílios de cinco (36%) propriedades (P3, P4, P5, P6 e P8) estavam de acordo com o limite máximo estabelecido.

Silva et al. (2011) encontraram altas contagens bacterianas nos equipamentos e utensílios ( $5,81 \log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup>) do ambiente de ordenha, superando a média

observada neste trabalho ( $3,15 \log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup>). Uma correlação positiva ( $r=0,77$ ) foi encontrada entre a contagem de aeróbios mesófilos e coliformes totais dos utensílios (Gráfico 4), o que é esperado, já que os coliformes totais são considerados micro-organismos mesófilos (FORSYTHE, 2013).

GRÁFICO 4 - RELAÇÃO ENTRE AERÓBIOS MESÓFILOS E COLIFORMES TOTAIS DOS UTENSÍLIOS.



LEGENDA: AM: aeróbios mesófilos, CT: coliformes totais, ○: 1 propriedade.

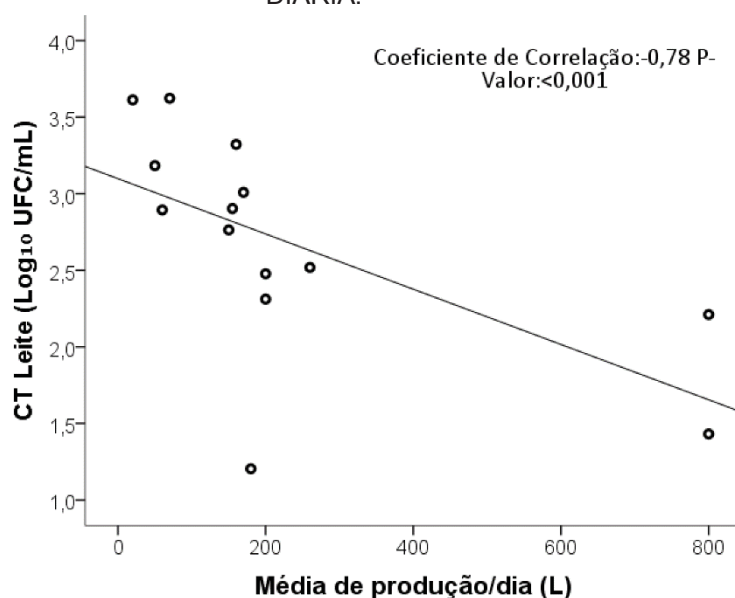
A higienização do ambiente de produção de alimentos promove o aumento da sua vida útil, além de garantir que o produto final não ofereça riscos à saúde humana. Portanto, o estabelecimento que processa qualquer tipo de alimento, deve manter as melhores condições higiênico-sanitárias possíveis, sendo a higienização de equipamentos e utensílios uma das maneiras de se obter um alimento seguro (VENDRAMINI, 2017).

#### 2.3.2.5 Leite

A legislação vigente estabelece o valor de 300.000 UFC/mL ( $5,48 \log_{10}$ ) como limite máximo para CBT do leite cru (BRASIL, 2018), três (P3, P11 e P12) das 14 propriedades (21%) produziram leite acima desse limite. Estas contagens são inferiores às publicadas por Lampugnani et al. (2018) no oeste paranaense, no qual, 46% (50) das amostras de leite cru extrapolavam o limite estabelecido pela legislação. As três propriedades deste estudo que ultrapassaram o limite máximo possuíam

produções mensais de 2.100, 1.500 e 600 litros, corroborando com Taffarel et al. (2015) onde a CBT foi significativamente maior no leite oriundo de propriedades com volume até 4.500 litros mensais. Também foi verificado que as contagens de CT apresentaram correlação negativa ( $r=-0,78$ ) em relação à média de produção diária (Gráfico 5), ou seja, o leite com menor contagem de CT pertencia a uma propriedade com uma maior produção diária. Esse resultado confirma a hipótese das propriedades que produzem menos, obtêm um leite com menos qualidade microbiológica.

GRÁFICO 5 - RELAÇÃO ENTRE COLIFORMES TOTAIS DO LEITE E MÉDIA DE PRODUÇÃO DIÁRIA.



Legenda: CT: coliformes totais, ○: 1 propriedade.

Os coliformes totais foram verificados em todas as amostras de leite (Gráfico 2), o que caracteriza problemas com contaminação ambiental. A metodologia utilizada neste trabalho (UFC/mL) não permite comparar com o valor estabelecido pela legislação (2-4 NMP/mL) (BRASIL, 2011), no entanto, para uma melhor visualização dos resultados e dos possíveis fatores de contribuição, foram estabelecidas três faixas de contagem de CT no leite (Quadro 2).



QUADRO 2 - FAIXAS DE CONTAGEM DE COLIFORMES TOTAIS NO LEITE E OS POSSÍVEIS FATORES DE CONTRIBUIÇÃO.

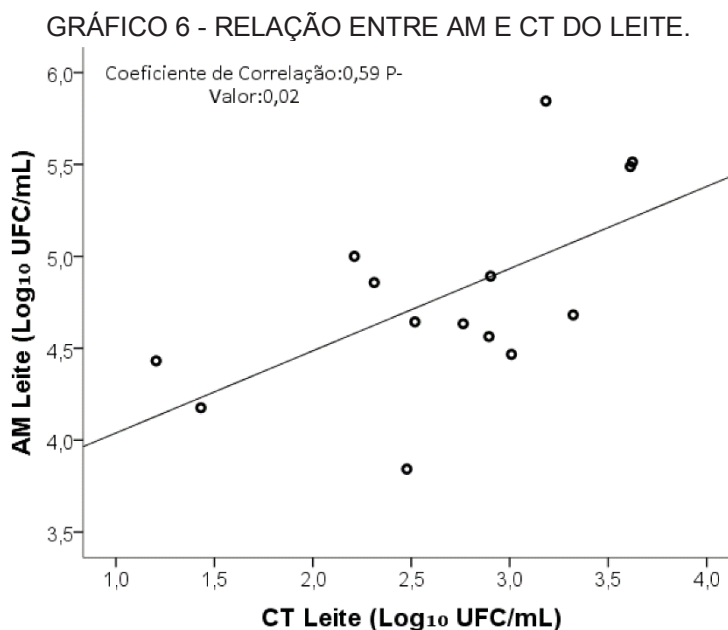
Contagem ( $\log_{10}$ UFC/mL)	Propriedades*	Fatores que podem contribuir**
1,00-2,00	9 e 13	Escolaridade <sup>9</sup>
2,00-3,00	10, 2, 4, 5, 7, 8 e 1	Escolaridade <sup>7, 8, 14, 10, 2</sup> , tanque de imersão <sup>1</sup>
> 3,00	14, 11, 6, 12 e 3	Baixa produção/animal <sup>11, 12, 3</sup> , escolaridade <sup>11, 6, 12</sup> , água tratada <sup>3, 12</sup> , tanque de imersão <sup>12, 3</sup>

NOTA: \*Propriedades ordenadas de acordo com a menor para a maior contagem de coliformes totais no leite.

\*\*Foram descritas somente as variáveis consideradas estatisticamente significativas.

O principal fator relacionado à contaminação por coliformes no leite foi a escolaridade dos ordenhadores (Quadro 2), como também constatado por Múnere-Bedoya et al. (2017), que afirmam que o maior nível de conhecimento e escolaridade dos trabalhadores favorece a qualidade do leite.

Foi encontrada uma correlação significativa ( $r=0,59$ ) entre as variáveis AM e CT do leite (Gráfico 6) como observado também nas contagens microbianas dos utensílios.



LEGENDA: AM: aeróbios mesófilos, CT: coliformes totais, ○: 1 propriedade.

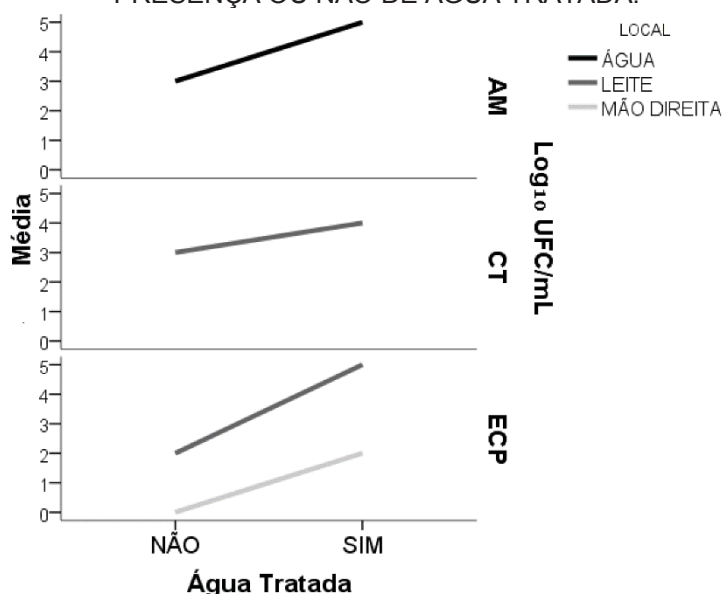
Observou-se a presença de ECP em leites de 12 (86%) propriedades (Gráfico 2), resultado acima de um trabalho com propriedades rurais do oeste paranaense, em que 50% das amostras de leite cru apresentaram ECP (LAMPUGNANI, 2016). Os ECP além de serem agentes causadores de mastite subclínica em vacas leiteiras, podem estar presentes no leite e derivados causando prejuízos à indústria e à saúde

do consumidor (JOFFE; BARANOVIČS, 2006). O gene da coagulase tem sido utilizado como uma das formas para a identificação e caracterização de *S. aureus* (KHOSHKHARAM-ROODMAJANI et al., 2014). Contaminações com enterotoxinas de *S. aureus* presentes em derivados lácteos fabricados com leite cru podem ser uma ameaça para a saúde humana (HUMMERJOHANN et al., 2014), causando intoxicação alimentar em humanos (DE BUYSER et al., 2001).

### 2.3.3 Relação das análises microbiológicas e as respostas dos questionários

Curiosamente nas propriedades em que havia água tratada, a contagem média de micro-organismos da água (AM), do leite (CT e ECP) e da mão direita (ECP) foi maior do que propriedades que utilizavam água de poço (Gráfico 7), rejeitando a hipótese de as amostras mais contaminadas pertencerem às propriedades com água não tratada.

GRÁFICO 7 - MÉDIA DE AM DA ÁGUA, CT E ECP DO LEITE E ECP DA MÃO DIREITA NA PRESENÇA OU NÃO DE ÁGUA TRATADA.



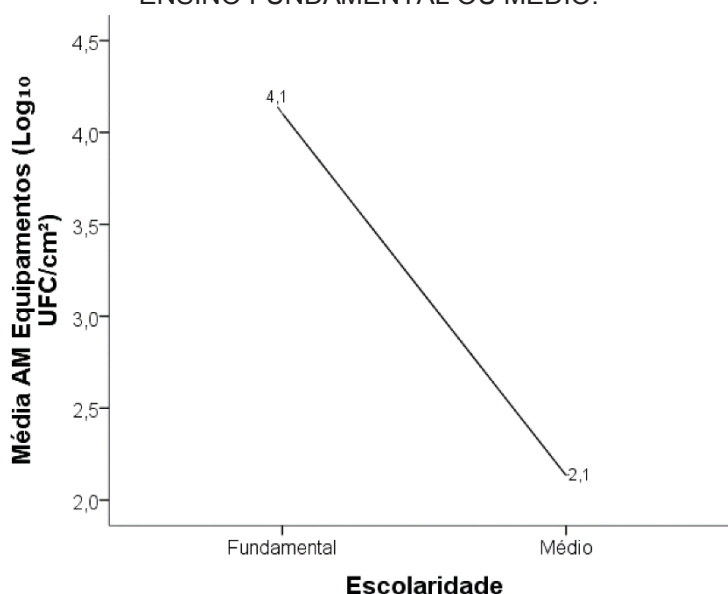
LEGENDA: AM: aeróbios mesófilos, CT: coliformes totais, ECP: estafilococos coagulase positiva.

A qualidade microbiológica da água utilizada na limpeza e sanitização do equipamento de refrigeração e utensílios em geral constitui um ponto crítico no processo de obtenção e refrigeração do leite, devendo ser adequadamente clorada (BRASIL, 2011). O resultado dessa análise não foi o esperado, já que na água tratada é obrigatória a manutenção de, no mínimo, 0,2 mg/L de cloro residual livre, 2 mg/L de

cloro residual combinado ou 0,2 mg/L de dióxido de cloro em toda a extensão do sistema de distribuição (BRASIL, 2017). O cloro é um produto químico eficiente para vários tipos de micro-organismos (VENDRAMINI, 2017). Alguns entrevistados relataram adicionar cloro em concentração desconhecida na água proveniente de poço artesiano/semi-artesiano. A quantificação dos níveis de cloro não estava prevista no momento do delineamento deste estudo, portanto, não foi realizada.

Os equipamentos pertencentes aos entrevistados que estudaram até o ensino médio tinham contagens de AM mais baixas do que os que estudaram até o ensino fundamental (Gráfico 8), confirmando a hipótese de que quanto maior o nível de escolaridade, maiores os cuidados com as práticas de ordenha.

GRÁFICO 8 - MÉDIA DE AM DOS EQUIPAMENTOS PERTENCENTES A PRODUTORES COM ENSINO FUNDAMENTAL OU MÉDIO.

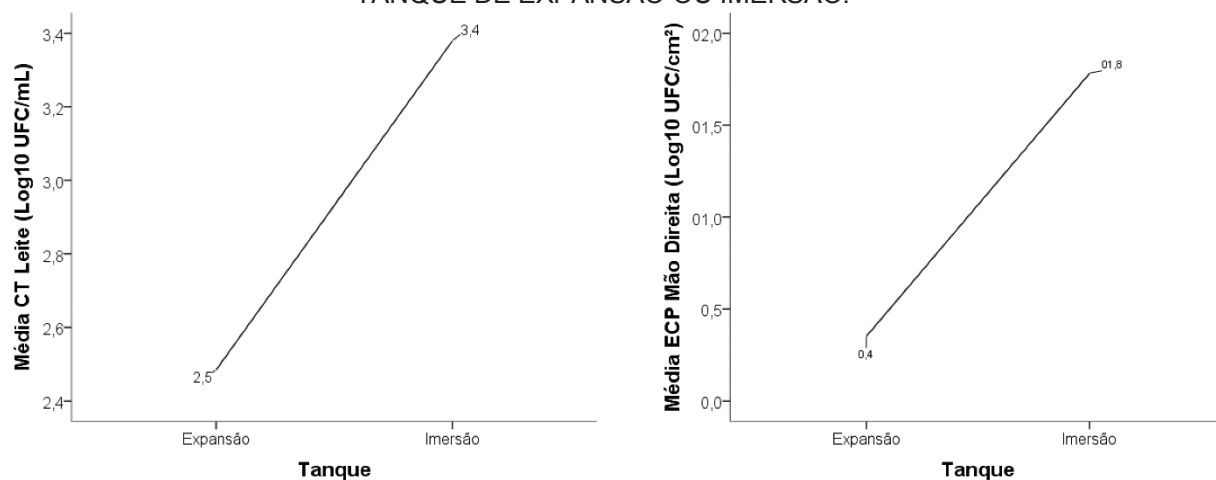


LEGENDA: AM: aeróbios mesófilos.

Produtores de leite rurais com escolaridade fundamental estão mais vulneráveis, tendem a realizar práticas que colocam em risco a sua saúde, a da sua família, a dos consumidores e a dos animais. Já os produtores com ensino médio buscam adotar práticas sanitárias mais desejáveis (BORSANELLI et al., 2014).

Propriedades que resfriavam o leite em tanque de expansão possuíam uma menor contagem de CT no leite e ECP na mão direita dos ordenhadores, confirmando a melhor eficiência na conservação do leite do que os que resfriavam em tanque em imersão (Gráfico 9).

GRÁFICO 9 - MÉDIA DE CT DO LEITE E ECP DA MÃO DIREITA DE PROPRIEDADES COM TANQUE DE EXPANSÃO OU IMERSÃO.



LEGENDA: CT: coliformes totais, ECP: estafilococos coagulase positiva.

Após a ordenha, no tempo máximo de 3 horas, o tanque de expansão permite a refrigeração do leite até uma temperatura igual ou inferior a 4°C, já o tanque de imersão refrigera em até 7°C (BRASIL, 2011). Essa diferença de queda de temperatura pode influenciar na qualidade microbiológica do leite. Nos municípios Palotina, Marechal Cândido Rondon e Nova Santa Rosa/PR, o leite refrigerado em tanques de imersão tinha uma CBT 2,6 vezes maior do que o leite refrigerado em expansão (LAMPUGNANI et al., 2018). O fato do número de ECP da mão ser maior nas propriedades que possuem tanque de imersão pode estar relacionada a uma maior manipulação, pois o leite é colocado em latões que vão dentro do tanque com água resfriada.

## 2.4 CONCLUSÃO

Com este estudo foi possível concluir que a contaminação do leite é influenciada pelo nível de conhecimento (escolaridade) dos trabalhadores do campo, pela realização ou não das boas práticas de ordenha, pelas condições das instalações e também pelo volume de produção. Em cada propriedade foi possível atribuir um ou mais desses fatores como influentes para os resultados observados. Assim, fica clara a necessidade de atenção individualizada às propriedades quando o objetivo é melhorar a qualidade do leite.

## **Agradecimentos**

Este trabalho faz parte do projeto “Perfil da produção de leite em busca da melhoria da qualidade”, agradecemos o apoio da Secretaria de Agricultura e Abastecimento de São José dos Pinhais, Paraná, especialmente ao médico veterinário Henrique Ventura.

## **Aprovação do Comitê de Ética Envolvendo Seres Humanos e da Comissão de Ética no Uso de Animais**

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/SD - PB), do Setor de Ciências da Saúde, sob protocolo nº 23277636 (Anexo 2) e pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias nº 034/2017 (Anexo 3), ambos da UFPR. Para preservar as informações pessoais dos produtores, assegurou-se a eles, o anonimato.

### 3 CAPÍTULO 3 - ARTIGO 2 - Resistência a antibióticos em *Staphylococcus aureus* provenientes do leite, ordenhadores e ambiente de ordenha

#### *Staphylococcus aureus* antibiotics resistance from milk, milkers and milking environment

Luany Yone Miyoshi<sup>5</sup>, Milimani Andretta<sup>6</sup>, Ricardo Seiti Yamatogi<sup>7</sup>, Luís Augusto Nero<sup>8</sup>, Julia Arantes Galvão<sup>9\*</sup>

#### RESUMO

O uso prolongado e indevido de antibióticos na pecuária aumenta a resistência de bactérias a vários antibióticos de diversas classes. O objetivo do trabalho foi isolar *Staphylococcus aureus* de diferentes amostras do ambiente de ordenha de vacas leiteiras e determinar seu perfil de resistência a antibióticos. Um total de 12 fazendas leiteiras foram visitadas periodicamente para coleta de 122 amostras (água = 12, leite cru do tanque de armazenamento = 12, ambiente de ordenha = 98) que foram submetidas a enumeração de estafilococos coagulase positiva (ECP). Isolados bacterianos (n = 56) foram obtidos das amostras que apresentaram contagens de ECP e submetidos a análises fenotípicas e genotípicas para identificação e caracterização de seus perfis de resistência a antibióticos. As contagens do micro-organismo no leite foram de  $\leq 1,0 \times 10^2$  a  $8,26 \times 10^4$  UFC/mL e no ambiente de ordenha foram de  $\leq 1,0 \times 10^2$  a  $6,64 \times 10^4$  UFC/cm<sup>2</sup>. Não foi possível detectar ECP na água (limite mínimo de detecção:  $1,0 \times 10^2$  UFC/mL). Entre os isolados selecionados, 53 (95.0%) foram identificados como *S. aureus* (*femA*), e apresentaram resistência a penicilina (9, 22.0%), oxacilina (5, 12.0%), clindamicina (3, 7.0%), eritromicina (2, 5.0%), estreptomicina (2, 5.0%), gentamicina (2, 5.0%) e tetraciclina (1, 2.0%); nenhum isolado apresentou resistência a ciprofloxacina e cloranfenicol. Em relação aos genes associados a resistência a diferentes antibióticos, 45 (85%) dos isolados apresentam *femB*, 10 (19%) *blaZ*, 5 (9%) *vanA*, 1 (2%) *mecC*, 1 (2%) *tetK*, e nenhum *mecA*. O presente estudo mostrou que o leite cru de São José dos Pinhais/PR contém quantidades consideráveis de *S. aureus* e apesar de a maioria das cepas ter sido sensíveis aos antibióticos testados, a maior frequência de resistência foi à penicilina o que pode indicar o uso indevido do antibiótico.

<sup>5</sup> Discente de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – Universidade Federal do Paraná (UFPR). Rua dos Funcionários, 1540, Juvevê, CEP 80035-060, Curitiba, PR, Brasil. Tel. (41) 3350-5811. E-mail: luanymiyoshi@gmail.com.

<sup>6</sup> Discente de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária – UFV/Viçosa, MG, Brasil. E-mail: miliandretta@gmail.com.

<sup>7</sup> Professor do Departamento de Medicina Veterinária – UFV/Viçosa, MG, Brasil. E-mail: ryamatogi@ufv.br.

<sup>8</sup> Professor do Departamento de Medicina Veterinária – UFV/Viçosa, MG, Brasil. E-mail: nero@ufv.br.

<sup>9</sup> Professora do Departamento de Medicina Veterinária – UFPR/Curitiba, PR, Brasil. E-mail: juliaarantesgalvao@gmail.com.

\* Autor para correspondência.

**Palavras-chave:** Antibiógrama. PCR. Produção leiteira. *Staphylococcus aureus* resistente.

## ABSTRACT

The misuse and overuse of antibiotics in livestock breeding increases the resistance of bacteria to several antibiotics of different classes. The aim of the study was to isolate *Staphylococcus aureus* from different samples of the dairy cow milking environment and determine the antibiotic resistance profile. A total of 12 dairy farms were visited periodically and 122 samples were collected (water = 12, raw milk from bulk tank = 12, milking environment = 98) and submitted to enumeration of coagulase positive staphylococci (CPS). Bacterial isolates (n = 56) were obtained from samples that presented CPS counts and submitted to phenotypic and genotypic analyzes to identify and characterize their antibiotic resistance profiles. The microorganism counts in the milk were  $\leq 1,0 \times 10^2$  to  $8.26 \times 10^4$  CFU / mL and in the milking environment were  $\leq 1,0 \times 10^2$  to  $6.64 \times 10^4$  CFU / cm<sup>2</sup>. CPS could not be detected in water (minimum detection limit:  $1,0 \times 10^2$  CFU / mL). Among the selected isolates, 53 (95.0%) were identified as *S. aureus* (*femA*) resistant to penicillin (9, 22.0%), oxacillin (5, 12.0%), clindamycin (3, 7.0%), erythromycin 2, 5.0%), streptomycin (2, 5.0%), gentamicin (2, 5.0%) and tetracycline (1, 2.0%); no isolates showed resistance to ciprofloxacin and chloramphenicol. For genes associated with resistance to different antibiotics, 45 (85%) of the isolates present *femB*, 10 (19%) *blaZ*, 5 (9%) *vanA*, 1 (2%) *mecC*, 1 (2%) *tetK*, and no *mecA*. This study suggests that the raw milk of São José dos Pinhais / PR present significant amounts of *S. aureus* and although most of the strains were sensitive to the antibiotics tested, the highest frequency of resistance was to penicillin, which may indicate the misuse of the antibiotic.

**Keywords:** Antibioqram. Dairy production. PCR. *Staphylococcus aureus* resistant.

## 3.1 INTRODUÇÃO

A produção de leite no Brasil foi de 33,5 bilhões de litros de leite em 2016 (IBGE, 2017), ocupando a terceira posição no ranking mundial, antecedido pelos Estados Unidos da América e Índia (FAO, 2017). Nesse contexto, o Paraná é o terceiro estado no ranking nacional com uma produção de 4,4 bilhões de litros de leite, sendo Minas Gerais e Rio Grande do Sul, os estados ranqueados à sua frente (IBGE, 2017).

Na pecuária leiteira, a mastite é a principal e mais comum doença das vacas, responsável por enormes perdas às indústrias de laticínios devido as alterações causadas à qualidade do leite (ACOSTA et al., 2016; KABIR et al., 2017; SEEGER; FOURICHON; BEAUDEAU, 2003), é também causadora de grande impacto na saúde e bem-estar animal (PETON; LE LOIR, 2014). O *Staphylococcus aureus* é o patógeno mais associado à mastite bovina, sendo capaz de colonizar a glândula mamária de

ruminantes e sobreviver por longos períodos, e determinando problemas também em relação a qualidade do leite produzido (KADARIYA; SMITH; THAPALIYA, 2014; RAJIĆ SAVIĆ; KATIĆ; VELEBIT, 2015).

*S. aureus* pode expressar vários fatores de patogenicidade, como produção de enterotoxinas, capacidade de invadir tecidos, virulência mediada por toxinas e resistência a antibióticos, sendo assim considerando uma preocupação em saúde pública (LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003). A utilização frequente de antibióticos para o tratamento de infecções causadas por *S. aureus* contribui para o desenvolvimento de resistência, sendo os genes relacionados facilmente transferidos para outros micro-organismos presentes em seres humanos e animais (DAKA; GSILASSIE; YIHDEGO, 2012; FLUIT, 2012). O uso prolongado e indevido de antibióticos na pecuária e no tratamento de doenças do ser humano aliado à superlotação, fácil circulação de patógenos e baixas condições de higiene aumenta a resistência de bactérias a vários antibióticos de diversas classes (DISEASES, 2015; VALSANGIACOMO et al., 2000).

A presença de cepas de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) é um indicativo do uso indevido de antibióticos para o controle da mastite (LIU et al., 2017; SHARMA et al., 2017). Além de testes fenotípicos para identificação de cepas MRSA, a pesquisa dos genes *femA*, *femB*, *mecA* e *mecC* também é usualmente empregada por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) (ALI, 2015). Adicionalmente, genes relacionados a resistência a outros antibióticos, como *vanA* (vancomicina), *blaZ* (beta-lactamase) e *tetK* (tetraciclina) também são pesquisados em *S. aureus* (AKANBI et al., 2017; ZEHRA et al., 2017).

O objetivo do trabalho foi isolar e avaliar o perfil de resistência a antibióticos em *S. aureus* obtido do ambiente de produção leiteira.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 Ambiente e coleta de amostras

Doze propriedades rurais com volume de produção entre 20 a 800 litros/dia localizadas na área rural de São José dos Pinhais, PR, foram visitadas entre novembro de 2017 e dezembro de 2018. Durante as visitas, as seguintes amostras foram coletadas: água utilizada na propriedade (n = 12) e leite cru oriundo de vacas



aparentemente saudáveis ( $n = 12$ ), utilizando sacos plásticos estéreis (Labplas Inc., Sainte-Julie, QC, Canadá); amostras superficiais das mãos dos ordenhadores ( $n = 24$ ), tetos de vacas ( $n = 24$ ), equipamentos (teteiras ou parede do tanque de armazenamento do leite,  $n = 24$ ) e utensílios (balde, latão e/ou coador,  $n = 24$ ) através de *swabs* previamente umedecidos (NaCl 0,85%, m/v) e moldes plásticos esterilizados de tamanhos variados (3 a 100 cm<sup>2</sup>); água residual de baldes e latões ( $n = 2$ ), quando identificados na propriedade rural. Todas as amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas e mantidas sob refrigeração até a realização de análises laboratoriais.

### 3.2.2 Enumeração de estafilococos coagulase positiva

As amostras foram diluídas em escala seriada decimal em solução salina (Dinâmica, Indaiatuba, Brasil) peptonada (Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra) e alíquotas de 0,1 mL foram semeadas em superfície e em duplicata em ágar *Baird-Parker* (Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra) suplementado com gema de ovo e telurito de potássio (NewProv, Pinhais, Brasil). Após incubação a 37°C por 48 horas, as colônias formadas foram enumeradas e classificadas como típicas (colônias pretas, grandes, com um halo de precipitação de sais e um halo translúcido) e atípicas. Colônias típicas e atípicas (3 a 5) foram selecionadas por amostra e transferidas para *Brain Heart Infusion* (BHI) (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, India), com incubação a 37°C por 24 horas; alíquotas de 0,3 mL das culturas obtidas foram transferidas para tubos contendo 0,3 mL de plasma de coelho (NewProv Pinhais, Brasil), com incubação a 37°C e verificação da formação de coágulo entre 6 e 24 horas. Isolados que apresentaram a capacidade de produzir coagulase foram estocados em ágar nutriente (Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra), identificados e caracterizados quanto aos seus perfis de resistência a antibióticos, como descrito a seguir (BRASIL, 2003). Considerando os resultados obtidos, as contagens foram expressas como unidades formadoras de colônias (UFC) por mL ou cm<sup>2</sup> (UFC/mL ou cm<sup>2</sup>) de estafilococos coagulase positiva.

### 3.2.3 Identificação de *Staphylococcus aureus*

As culturas identificadas como coagulase positiva (n = 85) foram submetidas a testes fenotípicos: catalase, Gram, DNase e fermentação de maltose. Isolados caracterizados como cocos Gram positivos, produtores de catalase e DNase e fermentadores de maltose foram identificados como *S. aureus*, e submetidos a pesquisa da presença do gene *femA*, conforme DIAS et al. (2011), para confirmação.

Alíquotas das culturas dos isolados selecionados (n = 53) foram submetidas a extração do DNA (AHMED et al., 2014; REYES-ESCOGIDO et al., 2010 mod.), utilizando Chelex 100 (Bio-Rad, Laboratories, CA, USA). Para o preparo do mix, foram utilizados *ependorfs* de 0,2 mL (Axygen, Union City, CA, USA) contendo 12,5 µL *GoTaq® wizard qPCR master* (Promega Corporation, Madison, USA), 9,5 µL água *nuclease free* (Promega Corporation, Madison, USA), 0,5 µL de cada *primer* (200 nMol Invitrogen™ Termo Fisher) e 2 µL do DNA extraído da amostra (40 ng/µL), com um volume total de 25 µL por reação. As reações foram realizadas em um termociclador (Bio-RAD T100™ Thermal Cycler). Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% (m/v, Kasvi, São José dos Pinhais, Brasil), corado com GelRed™ (Biotium, Inc., Fremont, CA, USA), utilizado o geneRuler marcador de massa molecular de 100 pb DNA ladder (Promega Corporation, Madison, USA) e colocados nas cubas Biocom Direct Uniscience e reveladas no fotodocumentador L-PIX® (Loccus Biotecnologia, São Paulo, Brasil). As sequências dos primers, condições da reação e tamanho dos produtos de PCR considerados para interpretação estão descritos na Tabela 3.

### 3.2.5 Pesquisa de genes de resistência

Os isolados confirmados como *S. aureus* (n = 53) foram submetidos à PCR para pesquisa de genes de resistência antimicrobiana. Os genes pesquisados foram: *femB*, *mecA*, *vanA*, *blaZ*, *mecC* e *tetK*, conforme Botelho (2017). *S. aureus* ATCC 11229 foi utilizado como controle positivo para os *femA* e *mecA*. As etapas do preparo da reação e da eletroforese foram as mesmas utilizadas para o *femA*. As sequências dos primers, condições das reações e os tamanhos dos produtos de PCR considerados para interpretação estão descritos na Tabela 3.

TABELA 3 - GENES PESQUISADOS, SEQUÊNCIAS DOS PRIMERS E CONDIÇÕES DAS REAÇÕES DE PCR UTILIZADAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE *S. aureus* E DEFINIÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS EM ISOLADOS DE *S. aureus* OBTIDOS NA ORDENHA DE PROPRIEDADES DE SÃO JOSÉ DOS PINHAIS/PR.

Gene	Sequência de primers (5'-3')	Pares de bases (pb)	Condições de ciclagem	Referência
<i>femA</i>	F: AAAAAAGCACATAACAAGCG R: GATAAAGAAGAAACCAGCAG	132	Desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de 95°C por 30 s, 53°C por 30 s e 72°C por 30 s. Extensão final a 72°C por 5 minutos.	Dias et al., 2011 (mod.)
<i>femB</i>	F: TTACAGAGTTAACTGTTACC R: ATACAAATCCAGCACGCTCT	651	Desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de 95°C por 30 s, 53°C por 30 s e 72°C por 150 s. Extensão final a 72°C por 5 minutos.	Kobayashi et al., 1994 (mod.)
<i>mecA</i>	F: AGTTCTGCAGTACCGGATTTC R: AAAATCGATGGTAAAGGTTTG GC	533	Desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida por 40 ciclos de 95°C por 30 s, 52°C por 30 s e 72°C por 60 s. Extensão final a 72°C por 10 minutos.	Lee, 2003 (mod.)
<i>mecC</i>	F: GAAAAAAGGCTTAGAACGCCCTC R: GAAGATCTTTCCGTTTTTCAGC	138	Desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida por 30 ciclos de 94°C por 25 s, 52°C por 40 s e 72°C por 50 s. Extensão final a 72°C por 10 minutos.	Vesterholm-Nielsen et al., 1999
<i>blaZ</i>	F: AGAGATTTGCCTATGCTTC R: CTTGACCAACCTTTTATCAGC	516	Desnaturação inicial a 94°C por 7 minutos, seguida por 40 ciclos de 94°C por 60 s, 54°C por 60 s e 72°C por 60 s. Extensão final a 72°C por 7 minutos.	Vesterholm-Nielsen et al., 1999
<i>vanA</i>	F: ATGGCAAGTCAGGTGAAATGG R: TCCACCTCGCCAACAACCTAACG	399	Desnaturação inicial a 94°C por 7 minutos, seguida por 40 ciclos de 94°C por 60 s, 54°C por 60 s e 72°C por 60 s. Extensão final a 72°C por 7 minutos.	Woodford et al., 1993 (mod.)
<i>tetK</i>	F: GTAGCGACAATAGGTAATAGT R: GTAGTGACAATAAACCTCCTA	360	Desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos, seguida por 30 ciclos de 94°C por 30 s, 55°C por 30 s e 72°C por 30 s. Extensão final a 72°C por 30 segundos.	Strommenger et al., 2003

LEGENDA: mod.: modificado.

### 3.2.6 Antibiógrama

Entre os isolados de *S. aureus* que apresentaram diferentes genes de resistência por PCR, 40 foram selecionados e submetidos ao antibiógrama, seguindo o método de difusão em disco de Kirby-Bauer (CLSI, 2017). Alíquotas dos isolados selecionadas foram estriadas em ágar BHI (Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra), incubadas a 37°C por 24 horas, e colônias isoladas suspensas NaCl 0,85% (m/v) até obtenção de uma suspensão com turbidez semelhante a escala 0,5 McFarland, que corresponde a aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL. As suspensões dos isolados foram então distribuídas uniformemente na superfície de ágar Mueller Hinton (Kasvi, São José dos Pinhais, Brasil), e após secagem foram avaliados quanto a resistência a 9 antibióticos (Tabela 4). Após incubação a 37°C por 24 horas, os halos de inibição (quando presentes) foram mensurados com paquímetro e os isolados classificados como resistentes ou sensíveis aos antibióticos avaliados (CLSI, 2017).

TABELA 4 - ANTIBIÓTICOS E AS CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE RESISTÊNCIA EM ISOLADOS DE *Staphylococcus aureus* PELA METODOLOGIA DISCO-DIFUSÃO.

Classe	Antibiótico	Interpretação do halo			Concentração
		S	I	R	
Quinolona	Ciprofloxacina	≥21	16-20	≤15	5 µg
Lincosamida	Clindamicina	≥21	15-20	≤14	2 µg
Fenicol	Cloranfenicol	≥18	13-17	≤12	30 µg
Macrolídeo	Eritromicina	≥23	14-22	≤13	15 µg
Aminoglicosídeo	Estreptomicina*	16	14-15	13	10 µg
Aminoglicosídeo	Gentamicina	≥15	13-14	≤12	10 µg
Penicilina	Oxacilina	≥18	-	≤17	1 µg
Penicilina	Penicilina	≥29	-	≤28	10 UI
Tetraciclina	Tetraciclina	≥19	15-18	≤14	30 µg

LEGENDA: \*Média da classe dos aminoglicosídeos - não existe referência para diâmetro de halo de estreptomicina para *S. aureus*; S: sensível; I: intermediário; R: resistente.

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De um total de 122 amostras avaliadas, 23 apresentaram contagens de estafilococos coagulase positiva (Tabela 5), com predominância nas amostras de leite (10/22), seguida da mãos (5/22), tetos (4/22), água residual (2/22), equipamentos (1/22), e coador (1/22), todas as amostras de água apresentaram  $\leq 1,0 \times 10^2$  UFC/ml para o micro-organismo.

TABELA 5 - CONTAGENS MÍNIMAS E MÁXIMAS DE ECP NAS AMOSTRAS AVALIADAS DO LEITE E AMBIENTE DE ORDENHA.

Contagens de ECP (UFC/cm <sup>2</sup> ou UFC/mL)	Mínimo	Máximo
Leite	$\leq 1,0 \times 10^2$	$8,2 \times 10^4$
Mãos	$\leq 1,0 \times 10^2$	$3,4 \times 10^2$
Tetos	$\leq 1,0 \times 10^2$	$1,2 \times 10^5$
Água residual	$\leq 1,0 \times 10^2$	$9,1 \times 10^2$
Equipamentos	$\leq 1,0 \times 10^2$	$3,1 \times 10^2$
Coador	$\leq 1,0 \times 10^2$	$1,3 \times 10^1$

LEGENDA: ECP: estafilococos coagulase positiva.

Oitenta e cinco colônias foram obtidas dessas amostras e analisadas por testes fenotípicos para identificação preliminar de *S. aureus*, e 56 isolados apresentaram características compatíveis com essa espécie. A presença do gene *femA* foi confirmada em 53 desses isolados, permitindo a identificação como *S. aureus*. Esses isolados foram originários de amostras de leite (33, 62%), mãos (11, 21%), tetos (4, 8%), teteiras (2, 4%), água residual (2, 4%) e coador (1, 2%) (Tabela 6). Os resultados obtidos indicam altas frequências de amostras de leite cru positivas para *S. aureus*, principalmente em comparação com estudos similares desenvolvidos em outros países e regiões do Brasil (CASANOVA et al., 2016; DAKA; GSILASSIE; YIHDEGO, 2012; JAMALI et al., 2015). A presença de *S. aureus* no leite cru está associada com precárias práticas de ordenha e manipulação inadequada de animais, utensílios e equipamentos de ordenha, evidenciando a importância dessas práticas para a obtenção de leite com alta qualidade (ARENAS et al., 2017; KATEETE et al., 2013).

TABELA 6 – NÚMERO DE ISOLADOS POSITIVOS PARA OS GENES DE IDENTIFICAÇÃO DO *Staphylococcus aureus* E DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS.

	<i>femA</i> n (%)	<i>femB</i> n/53	<i>mecA</i> n/53	<i>mecC</i> n/53	<i>vanA</i> n/53	<i>blaZ</i> n/53	<i>tetK</i> n/53
Leite	33 (62)	28	0	1	3	7	0
Mãos	11 (21)	8	0	0	2	2	1
Tetos	4 (8)	4	0	0	0	0	0
Teteiras	2 (4)	2	0	0	0	1	0
Água residual	2 (4)	2	0	0	0	0	0
Coador	1 (2)	1	0	0	0	0	0
Total	53 (100)	45	0	1	5	10	1

LEGENDA: n: número de isolados positivos.

Todas as amostras apresentaram isolados positivos para os genes *femA* e *femB* (Tabela 6), os quais são exclusivos do *S. aureus* (DIAS et al., 2011; PÉREZ-ROTH et al., 2001). Kobayashi et al. (2003) detectaram taxas de 89% do *femA* e 97%

do *femB* em *S. aureus*, e concluíram que a detecção desses genes de forma simultânea pode confirmar a presença de MRSA. O *femB* é responsável pela codificação de um fator essencial para a resistência à meticilina (PÉREZ-ROTH et al., 2001).

A pesquisa do gene *mecA*, é considerada o padrão ouro para detecção de cepas de MRSA (MIMICA et al., 2007). A resistência à meticilina ocorre devido à presença do gene *mecA*, que produz uma proteína de ligação à penicilina (PBP2a), apresentando pouca afinidade por beta-lactâmicos, grupo pertencente à meticilina (Müller, 2009). O *mecA* não foi encontrado em nenhum isolado neste estudo (Tabela 6). Pekana e Green (2018) encontraram resultado semelhante, com ausência do *mecA* nas 200 amostras de leite que avaliaram.

Já o *mecC* que é um análogo do *mecA* (ALI, 2015; PATERSON et al., 2013) foi amplificado em uma (2%) amostra de leite. No Egito, 35 amostras de vacas mastíticas e normais foram verificadas quanto à presença de *mecA*, *mecC* e *femB*, 13 (37%) amostras foram positivas para o gene *femB* que confirma *S. aureus*, dessas, 6/13 (46%) amostras eram MRSA (*mecA* positivo), as outras 7/13 (54%) eram *Staphylococcus aureus* suscetíveis à meticilina (MSSA) e nenhuma *mecC* (Ali, 2015).

Dos 53 isolados de *S. aureus*, 10 (19%) foram *blaZ* positivo (Tabela 6). A expressão do gene *blaZ* determina resistência aos beta-lactâmicos, e caracteriza a produção de penicilinas/beta-lactamases, enzimas responsáveis por inativar os beta-lactâmicos, os quais são um grupo de antibióticos, constituído por penicilinas, incluindo a meticilina, cefalosporinas, cefamicinas, monobactâmicos e carbapenemos (LOWY, 2003; ZSCHECK; MURRAY, 1993). No Japão, a prevalência do *blaZ* é baixa, tendo sido relatados resultados de 2,7%, 3,5% e 1% entre os isolados de *S. aureus* (TAKAYAMA et al., 2017). Ao contrário do trabalho de Jamali et al. (2015), em que 46% dos *S. aureus* de leite cru e produtos lácteos de uma província do Irã mostraram resistência aos beta-lactâmicos.

O mesmo isolado proveniente do leite positivo para o *mecC* também foi positivo para o *vanA* (Tabela 6), demonstrando a resistência à vancomicina, a qual está relacionada à obtenção de um plasmídeo contendo o gene *vanA*, proveniente do micro-organismo *Enterococcus faecalis* (PÉREZ-ROTH et al., 2001). A ocorrência de cepas de MRSA resistentes à vancomicina é raramente relatada em animais, o primeiro relato de VRSA em alimentos de origem animal ocorreu na Índia (BHATTACHARYYA et al., 2016). A importância deste achado está no fato da

vancomicina ser a droga de eleição no caso de infecções graves por MRSA (VAS et al., 2014), o que pode contribuir para a resistência ao medicamento, porém, o mesmo não é muito utilizado na prática veterinária (SHARMA et al., 2017). A presença de isolados positivos para *vanA* em leite e mãos de ordenhadores é preocupante; embora não seja possível determinar a origem desses isolados, a sua presença em múltiplos locais indica a sua circulação no ambiente de produção leiteira.

O gene *tetK* encontrado nas mãos de um ordenhador (Tabela 6), confere resistência à tetraciclina por meio de proteínas de efluxo que impedem a acumulação de tetraciclina dentro das células (PÉREZ-ROTH et al., 2001; SCHMITZ et al., 2001).

Todos os isolados apresentaram de 78 a 100% de sensibilidade aos antibióticos testados (Tabela 7). Olufemi et al. (2018) observaram altas frequências de susceptibilidade à gentamicina, ciprofloxacina e tetraciclina em isolados de *S. aureus* obtidos de leite de vacas aparentemente saudáveis. Outro trabalho com estafilococos coagulase positiva proveniente das mãos de manipuladores de alimentos apresentaram 96% de suscetibilidade ao cloranfenicol (MARTINS et al., 2009). Pekana e Green (2018) encontraram uma alta sensibilidade em isolados de *S. aureus* a vários antibióticos, incluindo ciprofloxacina, cloranfenicol e clindamicina, os quais também foram testados nesse estudo.

TABELA 7 – FREQUÊNCIA DE ISOLADOS SUSCETÍVEIS, INTERMEDIÁRIOS E RESISTENTES AOS ANTIBIÓTICOS TESTADOS.

Antibióticos (µg)	Teste de resistência antimicrobiana		
	S n (%)	I n (%)	R n (%)
Ciprofloxacina (5)	38 (95%)	2 (5%)	0
Clindamicina (2)	37 (93%)	0	3 (7%)
Cloranfenicol (30)	40 (100%)	0	0
Eritromicina (15)	32 (80%)	6 (15%)	2 (5%)
Estreptomicina (10)	37 (93%)	1 (2%)	2 (5%)
Gentamicina (10)	37 (93%)	1 (2%)	2 (5%)
Oxacilina (1)	35 (88%)	-	5 (12%)
Penicilina (10 UI)	31 (78%)	-	9 (22%)
Tetraciclina (30)	38 (96%)	1 (2%)	1 (2%)

LEGENDA: S: suscetível; I: intermediário; R: resistente; n: número de isolados.

A frequência de resistência intermediária variou de 0 a 15% (Tabela 7). Também apresentaram resistência intermediária: dois isolados (5%) à ciprofloxacina, um (2%) à estreptomicina, um (2%) à gentamicina e um (2%) à tetraciclina. Nenhum isolado foi intermediário à clindamicina e ao cloranfenicol, a oxacilina e a penicilina não possuem faixa de halo intermediário (CLSI, 2017).



Já a frequência de resistência foi baixa: 0 a 22% (Tabela 7). Dentro dessa faixa, sendo que os *S. aureus* foram mais resistentes à penicilina, seguido da oxacilina (12%), clindamicina (7%), eritromicina e gentamicina (5%) e tetraciclina (2%). Nenhum isolado apresentou resistência à ciprofloxacina e ao cloranfenicol (Tabela 7). Das amostras de leite da Etiópia, Daka, Gsilassie e Yihdego (2012) também não encontraram nenhum dos isolados de *S. aureus* resistentes à ciprofloxacina. Diferente dos resultados de trabalhos realizados no Rio Grande do Sul com vacas com mastite subclínica, leite cru de caminhões no Irã e leite cru dos quartos individuais de vacas na Índia, esses resultados apresentaram cepas com uma resistência de 40 a 96% à ciprofloxacina, oxacilina, gentamicina, tetraciclina e penicilina (FREITAS et al., 2018; KHODADADI et al., 2016; SHARMA et al., 2017).

O gene *blaZ* foi identificado em 10 (19%) isolados, dos quais 7 (70%) foram fenotipicamente resistentes à penicilina e dois à oxacilina (Tabela 8). Esses resultados foram semelhantes aos observados por Pekana e Green (2018), que encontraram em 14,9% dos isolados obtidos de leite e carcaças bovinas que apresentaram o gene *blaZ*.

Neste estudo, cinco isolados foram genotipicamente resistentes à vancomicina (Tabela 8). A avaliação da resistência fenotípica foi realizada pelo método disco-difusão de Kirby-Bauer, porém, para uma caracterização mais refinada, o teste de concentração inibitória mínima (MIC) é recomendado para avaliar especificamente a resistência à vancomicina (CLSI, 2017).

O único isolado resistente à tetraciclina, positivo para o *tetK*, também foi resistente pelo teste fenotípico (Tabela 8). Shamila-Syuhada et al. (2016) também encontraram apenas um (6%) isolado *tetK* positivo do leite cru de uma propriedade leiteira na Malásia.



TABELA 8 - NÚMERO DE ISOLADOS DE *S. aureus* POSITIVOS PARA OS GENES DE RESISTÊNCIA E CLASSIFICAÇÃO EM SUSCETÍVEIS, INTERMEDIÁRIOS E RESISTENTES AOS ANTIBIÓTICOS TESTADOS OBTIDOS DE AMOSTRAS DO AMBIENTE DE ORDENHA DE PROPRIEDADES RURAIS DE SÃO JOSÉ DOS PINHAIS/PR.

Propriedade	Amostra	Nº de isolados <i>S. aureus</i>	Genes					Antibiograma - Interpretação dos halos									
			<i>femB</i>	<i>mecA</i>	<i>mecC</i>	<i>vanA</i>	<i>blaZ</i>	<i>tetK</i>	CIP	CLI	CLO	ERI	EST	GEN	OXA	PEN	TET
1	Leite	2	2						I	S	S	S	S	S	S	S	S
	Teteira	2	2			1			S	S	S	S	S	S	S	S	S
	Teto	1	1						X	X	X	X	X	X	X	X	X
2	Leite	2				2	2		S	R	S	R	1R+1I	S	R	R	S
	Coador	1	1						X	X	X	X	X	X	X	X	X
3	Leite	2	2						S	R	S	S	S	S	R	R	1S+1I
	Mão direita	3	3						S	S	S	S	S	4S+1R	S	S	S
	Mão esquerda	5	3			2	2		S	S	S	4S+1I	S	S	4S+1R	S	S
4	Leite	3	3						S	S	S	S	S	S	S	S	S
	Mão direita	1	1					1	S	S	S	S	S	S	R	R	R
	Água res.	2	2						S	S	S	1S+1I	S	S	S	S	S
5	Leite	4	2						S	S	S	S	S	S	S	S	S
	Teto	3	2						S	S	S	S	S	S	S	S	S
6	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Leite	3	2	1	1				2S+1I	S	S	2S+1I	2S+1R	1I+2R	S	S	S
8	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	Leite	5	5			4			S	S	S	4S+1I	S	S	1S+4R	S	S
10	Leite	6	6			1			S	S	S	4S+2I	S	S	S	S	S
11	Leite	5	5						S	S	S	S	S	S	S	S	S
12	Leite	1	1						S	S	S	S	S	S	S	S	S
	Mão direita	1	1						S	S	S	S	S	R	S	S	S

LEGENDA: CIP: ciprofloxacina, CLI: clindamicina, CLO: cloranfenicol, ERI: eritromicina, EST: estreptomicina, GEN: gentamicina, OXA: oxacilina, PEN: penicilina, TET: tetraciclina, S: suscetível, I: intermediário, res.: residual.

### 3.4 CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que o leite cru das propriedades rurais de São José dos Pinhais/PR contém quantidades consideráveis de *Staphylococcus aureus* e se consumido sem tratamento térmico adequado, pode ser um risco potencial à saúde do ser humano. Apesar de a maioria das cepas ter sido sensíveis aos antibióticos testados, a maior frequência de resistência foi à penicilina, o que pode indicar o uso indevido do antibiótico, implicando em cepas de *S. aureus* resistentes.

## REFERÊNCIAS

- ACOSTA, A. C. et al. Mastitis in ruminants in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 7, p. 565–573, 2016.
- AHMED, O. B.; ASGHAR, A. H.; ELHASSAN, M. M. Comparison of three DNA extraction methods for polymerase chain reaction (PCR) analysis of bacterial genomic DNA. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 6, p. 598–602, 2014.
- AKANBI, O. E. et al. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from recreational waters and beach sand in Eastern Cape Province of South Africa. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, n. 9, p. 1–15, 2017.
- ALI, A. Detection of *mecA*, *mecC* and *femB* Genes by Multiplex Polymerase Chain Reaction. **Journal of Veterinary Advances**, v. 6, n. 12, p. 1–7, 2015.
- AMENU, K.; SHITU, D.; ABERA, M. Microbial contamination of water intended for milk container washing in smallholder dairy farming and milk retailing houses in southern Ethiopia. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1, p. 1195, 2016.
- ANDREWS, W. H.; HAMMACK, T. Salmonella. In: U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological analytical manual**. Center for Food Safety and Applied Nutrition. 2007. Cap 5. p. 1–21.
- ARCURI, E. F. et al. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 3, p. 440–446, 2006.
- ARENAS, N. E. et al. Screening food-borne and zoonotic pathogens associated with livestock practices in the Sumapaz region, Cundinamarca, Colombia. **Tropical Animal Health and Production**, v. 49, n. 4, p. 739–745, 2017.
- BATTAGLINI, A. et al. DIFUSÃO DE BOAS PRÁTICAS E CARACTERIZAÇÃO DE PROPRIEDADES LEITEIRAS. **Archivos de Zootecnia**, v. 62, n. 237, p. 151–154, 2013.
- BELOTI, V. et al. IMPACTO DA IMPLANTAÇÃO DE BOAS PRÁTICAS DE HIGIENE NA ORDENHA SOBRE A QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DO LEITE CRU REFRIGERADO. **Revista do Instituto Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, n. 388, p. 5–10, 2012.
- BELOTI, V. **Leite: Obtenção, Inspeção e Qualidade**. Londrina: Editora Planta, 2015. 417p.
- BHATTACHARYYA, D. et al. First Report on Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Bovine and Caprine Milk. **Microbial Drug Resistance**, v. 22, n. 8, p. 675–681, 2016.
- BIEGER, A.; LOBO, D. D. S. PRÁTICAS E RESULTADOS NA BOVINOCULTORA DE LEITE NO MUNICÍPIO DE TOLEDO – PR: UMA ANÁLISE ESTRATIFICADA DOS PRODUTORES. **Revista do Instituto Laticínios Cândido Tostes**, v. 65, n. 376, p. 47–54, 2010.

BONFOH, B. et al. Microbiological quality of cows' milk taken at different intervals from the udder to the selling point in Bamako (Mali). **Food Control**, v. 14, n. 7, p. 495–500, 2003.

BORSANELLI, A. C. et al. Escolaridade e volume de produção têm associação com a percepção de risco de produtores de leite no uso de produtos veterinários. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 10, p. 981–989, 2014.

BORTOLI, J. DE et al. QUALIDADE DA ÁGUA DE POÇOS PARTICULARES DO MUNICÍPIO DE ENCANTADO, VALE DO TAQUARI-RS. **Revista Caderno Pedagógico**, v. 14, n. 1, p. 217–229, 2017.

BOTELHO, C. V. **Staphylococcus coagulase positiva E Staphylococcus aureus RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS EM CADEIA PRODUTIVA DE CARNE SUÍNA**. 2017. 99 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2017.

BOZO, G. A. et al. Adequação da contagem de células somáticas e da contagem bacteriana total em leite cru refrigerado aos parâmetros da legislação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 2, p. 589–594, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003**. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Diário Oficial da União [da] República Federativa do Brasil, Brasília, 18 set. 2003, Seção 1, p. 14.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011**. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. Diário Oficial da União [da] República Federativa do Brasil, Brasília, 30 dez. 2011. Seção 1, p. 6.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução Normativa nº 31, de 29 de junho de 2018**. Art. 1º A Tabela 2 do item 3.1.3.1, do Anexo II da Instrução Normativa nº. 62, de 29 de dezembro de 2011, que aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, alterada pela Instrução Normativa nº 7, de 3 de maio de 2016. Diário Oficial da União [da] República Federativa do Brasil, Brasília, 02 jul. 2018. Seção 1, p. 2.

BRASIL. Ministério da Saúde (MS). **Portaria de Consolidação nº 5, anexo XX, de 28 de setembro de 2017**. Consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde. Diário Oficial da União [da] República Federativa do Brasil, Brasília, 03 out. 2017.

BRITO, J. R. F.; BRITO, M. A. V. P. E.; VERNEQUE, R. D. S. Contagem bacteriana da superfície de tetas de vacas submetidas a diferentes processos de higienização, incluindo a ordenha manual com participação do bezerro para estimular a descida do leite. **Ciência Rural**, v. 30, n. 5, p. 847–850, 2000.

CASANOVA, V. P. et al. Bovine mastitis: Prevalence and antimicrobial susceptibility profile and detection of genes associated with biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 3, p. 1369–1378, 2016.

CLAEYS, W. L. et al. Consumption of raw or heated milk from different species: An evaluation of the nutritional and potential health benefits. **Food Control**, v. 42, p. 188–201, 2014.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. CLSI document M100 – 27<sup>a</sup> ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017. 282p.

COOREVITS, A. et al. Comparative analysis of the diversity of aerobic spore-forming bacteria in raw milk from organic and conventional dairy farms. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 126–140, 2008.

CORTEZ, M. A. S. Composição do Leite. In: NERO, L. A.; DA CRUZ, A. G.; BERSOT, L. DOS S. (Ed.). **Produção, processamento e fiscalização de leite e derivados**. 1 ed. São Paulo: Atheneu, 2017. p. 33–74.

DAKA, D.; GSILASSIE, S.; YIHDEGO, D. Antibiotic-resistance *Staphylococcus aureus* isolated from cow's milk in the Hawassa area, South Ethiopia. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 11, n. 1, p. 1-6, 2012.

DANELUZ, D.; TESSARO, D. Padrão físico-químico e microbiológico da água de nascentes e poços rasos de propriedades rurais da região sudoeste do Paraná. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 82, p. 1–5, 2015.

DE BUYSER, M. L. et al. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialized countries. **Internacional Journal of Food Microbiology**, v. 67, n. 1-2, p. 1–17, 2001.

DIAS, N. L. et al. Detecção dos genes de *Staphylococcus aureus*, enterotoxinas e de resistência à metilicina em leite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 6, p. 1547–1552, 2011.

DISEASES, T. L. I. Antimicrobial resistance: the Hydra among us. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 15, n. 11, p. 1243, 2015.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C. A. F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1315–1320, 2004.

FAO. Food and Agriculture Organization. **Production of Milk, whole fresh cow: top 10 producers**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL/visualize>>. Acesso em: 31 jan. 2019.

FEHLHABER, K; JANETSCHKE, P. **Higiene veterinaria de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1995. 669p.

FLUIT, A. C. Livestock-associated *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 8, p. 735–744, 2012.

FONTANA, V. L. D. S. et al. Caracterização molecular de estafilococos isolados de vacas com mastite subclínica e ordenhadores. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, n. 4, p. 469–476, 2012.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança dos Alimentos**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 607p.

FREITAS, C. H. et al. Identification and antimicrobial susceptibility profile of bacteria causing bovine mastitis from dairy farms in Pelotas, Rio Grande do Sul. **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, n. 4, p. 661–666, 2018.

GUERREIRO, P. K. et al. Qualidade Microbiológica de Leite em Função de Técnicas Profiláticas no Manejo de Produção. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 1, p. 216–222, 2005.

HARAN, K. P. et al. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus*, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, isolated from bulk tank milk from Minnesota dairy farms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 688–695, 2012.

HUMMERJOHANN, J. et al. Enterotoxinproducing *Staphylococcus aureus* genotype B as a major contaminant in Swiss raw milk cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 3, p. 1305–12, 2014.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Agropecuário 2017 – Resultados preliminares**. Disponível em: <[https://censoagro2017.ibge.gov.br/templates/censo\\_agro/resultadosagro/pdf/producao.pdf](https://censoagro2017.ibge.gov.br/templates/censo_agro/resultadosagro/pdf/producao.pdf)>. Acesso em: 20 out. 2018.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Confronto dos resultados dos dados estruturais dos Censos Agropecuários**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/21814-2017-censo-agropecuario.html?edicao=21858&t=resultados>>. Acesso em: 03 fev. 2018.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária - **Pesquisa Trimestral do Leite**. Estatística da Produção Pecuária. Dezembro de 2018. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/home/leite/brasil>>. Acesso em: 03 fev. 2018.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa da Pecuária Municipal - PPM**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?=&t=resultados>>. Acesso em: 20 out. 2018.

ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. **Microorganismos em Alimentos 8 - Utilização de Dados para Avaliação do Controle de Processo e Aceitação de Produto**. 1. ed. São Paulo: Blucher, 2015. 536p.

ISSENHUTH-JEANJEAN, S. et al. Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, v. 165, n. 7, p. 526–530, 2014.

JAMALI, H. et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk and dairy products. **Food Control**, v. 54, p. 383–388, 2015.



- JANSEN, J. et al. Explaining mastitis incidence in Dutch dairy farming: The influence of farmers' attitudes and behaviour. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 92, n. 3, p. 210–223, 2009.
- JOFFE, R.; BARANOVIČS, E. Bovine Mastitis As the Primary Contamination Source of Milk and Milk Products With *S. aureus* Enterotoxins. **VETERINARIJA IR ZOOTECHNIKA**, v. 36, n. 58, p. 21–26, 2006.
- KABIR, M. H. et al. Prevalence and identification of subclinical mastitis in cows at BLRI Regional Station, Sirajganj, Bangladesh. **Journal of Advanced Veterinary and Animal Research**, v. 4, n. 3, p. 295–300, 2017.
- KADARIYA, J.; SMITH, T. C.; THAPALIYA, D. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Food-Borne Disease: An Ongoing Challenge in Public Health. **BioMed Research International**, p. 1–9, 2014.
- KAGKLI, D. M. et al. Contamination of milk by enterococci and coliforms from bovine faeces. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 5, p. 1393–1405, 2007.
- KATEETE, D. P. et al. 2013. Prevalence and Antimicrobial Susceptibility Patterns of Bacteria from Milkmen and Cows with Clinical Mastitis in and Around Kampala, Uganda. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e63413, 2013.
- KHODADADI, P. et al. Antibiotic Resistance and Detection of *femA* Gene in *Staphylococcus aureus* Isolates from Raw Milk. **Medical Laboratory Journal**, v. 10, n. 4, p. 40–45, 2016.
- KHOSHKHARAM-ROODMAJANI, H. et al. Molecular typing of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from Shiraz teaching hospitals by PCR-RFLP of coagulase gene. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 246–252, 2014.
- KOBAYASHI, N. et al. Detection of *mecA*, *femA*, and *femB* Genes in Clinical Strains of Staphylococci Using Polymerase Chain Reaction. **Epidemiology and Infection**, v. 113, n. 2, p. 259–266, 1994.
- LAMPUGNANI, C. et al. QUALIDADE DO LEITE CRU REFRIGERADO E CARACTERÍSTICAS DA PRODUÇÃO LEITEIRA NA MESORREGIÃO OESTE PARANAENSE, BRASIL. **Revista do Instituto Cândido Tostes**, v. 73, n. 1, p. 19–26, 2018.
- LAMPUGNANI, C. ***Staphylococcus coagulase positiva em leite cru refrigerado: potencial enterotoxigênico e resistência a antimicrobianos***. 60f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Paraná, Palotina, 2016.
- LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetics and Molecular Research**, v. 2, n. 1, p. 63–76, 2003.
- LEE, J. H. Methicillin (Oxacilin) – resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potencial transmission to humans. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 11, p. 6489–6494, 2003.
- LIU, Y. A Biosurfactant-Inspired Heptapeptide with Improved Specificity to Kill MRSA. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 56, p. 1486–1490, 2017.

LOWY, F. Antimicrobial Resistance: The Example of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Investigation**, v. 3, n. 3, p. 1265–1273, 2003.

LOWY, F. Medical progress: *Staphylococcus aureus* infections. **New England Journal of Medicine**, v. 339, n. 8, p. 520–532, 1998.

MARCONDES, M. I. et al. Impact of farm size on milk quality in the Brazilian dairy industry according to the seasons of the year. **Ciência Rural**, v. 47, n. 11, p. 1–8, 2017.

MARTINS, S. C. S. et al. Perfil de resistência de cepas de *Staphylococcus coagulase positiva* isoladas de manipuladores de alimentos. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 43–52, 2009.

MATSUBARA, M. T. et al. Boas práticas de ordenha para redução da contaminação microbiológica do leite no agreste Pernambucano. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 1, p. 277–286, 2011.

METZGER, S. A. et al. Influence of sampling technique and bedding type on the milk microbiota: Results of a pilot study. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 7, p. 6346–6356, 2018.

MIGUEL, P. R. R. et al. Incidência de contaminação no processo de obtenção do leite e suscetibilidade a agentes antimicrobianos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 1, p. 403–416, 2012.

MIMICA, M. J. et al. Detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from pediatric patients: is the cefoxitin disk diffusion test accurate enough? **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 11, n. 4, p. 415–417, 2007.

MÜLLER, R. **Pesquisa de anticorpos anti-PBP2a em pacientes colonizados por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA)**. 2009. 72 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos) – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, em parceria com o Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2009.

MÚNERA-BEDOYA, O. D. et al. Influence of attitudes and behavior of milkers on the hygienic and sanitary quality of milk. **PLoS ONE**, v. 12, n. 9, p. 1–13, 2017.

NDAMBI, O. A. et al. Milk production systems in Central Uganda: a farm economic analysis. **Tropical Animal Health and Production**, v. 40, n. 4, p. 269–279, 2008.

NERO, L. A. et al. Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa 51. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 191–195, 2005.

NERO, L. A.; DA CRUZ, A. G. Microbiologia do Leite. In: NERO, L. A.; DA CRUZ, A. G.; BERSOT, L. DOS S. (Ed.). **Produção, processamento e fiscalização de leite e derivados**. 1 ed. São Paulo: Atheneu, 2017. p. 79–83.

OLUFEMI, F. O. et al. Prevalence and Antibigram of Methicilin-Susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) Isolated from Raw Milk of Asymptomatic Cows In Abeokuta, Nigeria. **Alexandria Journal of Veterinary Sciences**, v. 57, n. 2, p. 34–40, 2018.



PAIXÃO, M. G. et al. Impacto econômico da implantação das boas práticas agropecuárias relacionadas com a qualidade do leite. **Revista Ceres**, v. 61, n. 5, p. 612–621, 2014.

PARAFFIN, A. S.; ZINDOVE, T. J.; CHIMONYO, M. Perceptions of Factors Affecting Milk Quality and Safety among Large-and Small-Scale Dairy Farmers in Zimbabwe. **Journal of Food Quality**, p. 1-7, 2018.

PATERSON, G. K. et al. Prevalence and properties of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in bovine bulk tank milk in Great Britain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 3, p. 598–602, 2013.

PEKANA, A.; GREEN, E. Antimicrobial Resistance Profiles of *Staphylococcus aureus* Isolated from Meat Carcasses and Bovine Milk in Abattoirs and Dairy Farms of the Eastern Cape, South Africa. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 10, p. 2223, 2018.

PÉREZ-ROTH, E. et al. Multiplex PCR for simultaneous identification of *Staphylococcus aureus* and detection of methicillin and mupirocin resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 11, p. 4037–4041, 2001.

PEROBELLI, F. S.; ARAÚJO JUNIOR, I. F. DE; CASTRO, L. S. DE. As dimensões espaciais da cadeia produtiva do leite em Minas Gerais. **Nova Economia**, v. 28, n. 1, p. 297–337, 2018.

PETON, V.; LE LOIR, Y. *Staphylococcus aureus* in veterinary medicine. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 21, p. 602–615, 2014.

PICOLI, T. et al. Milk production characteristics in Southern Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 3, p. 1991–1998, 2015.

PIMENTEL, J. W. **Identificação dos Principais Pontos de Contaminação na Produção de Leite de Búfala e Implantação de Boas Práticas**. 55 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) – Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

QUIGLEY, L. et al. The complex microbiota of raw milk. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 5, p. 664–698, 2013.

RAJIĆ SAVIĆ, N.; KATIĆ, V.; VELEBIT, B. Characteristics of coagulase positive staphylococci isolated from milk in cases of subclinical mastitis. **Acta Veterinaria**, v. 5, p. 250–253, 2015.

RANGEL, A. C.; PALLARES, G. J.; CASTRO, F. G. DETERMINAÇÃO DE BOAS PRÁTICAS DE LEITE EM UM GRUPO DE GERENTES GERENCIANDO AGRICULTORES DE BOLSA DO ALTIPLANO CUNDIBOYACENSE. **Revista Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales**, v. 11, n. 1, p. 143–152, 2008.

REYES-ESCOGIDO, L. et al. Purification of bacterial genomic DNA in less than 20 min using chelex-100 microwave: Examples from strains of lactic acid bacteria isolated from soil samples. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 98, n. 4, p. 465–474, 2010.

RIBEIRO JÚNIOR, J. C. et al. Influência de Boas Práticas de Higiene de Ordenha na Qualidade Microbiológica do Leite Cru Refrigerado. **Revista do Instituto Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 6, p. 395–404, 2014.

SANT'ANA, S. A. Introduction to the special issue: *Salmonella* in foods: evolution, strategies and challenges. **Food Research International**, v. 45, p. 451-454, 2012.

SANTANA, E. H. W. DE et al. Contaminação do leite em diferentes pontos do processo de produção: I. Microrganismos aeróbios mesófilos e psicrotóxicos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, n. 2, p. 145–154, 2001.

SCHMITZ, F. et al. Resistência à tetraciclina e distribuição de genes de resistência à tetraciclina em isolados europeus de *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 47, n. 2, p. 239–240, 2001.

SEEGERS, H.; FOURICHON, C.; BEAUDEAU, F. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. **Veterinary Research**, v. 34, p. 475–491, 2003.

SHAMILA-SYUHADA, A. K. et al. Prevalence and antibiotics resistance of *Staphylococcus aureus* isolates isolated from raw milk obtained from small-scale dairy farms in Penang, Malaysia. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 36, n. 1, p. 98-102, 2016.

SHARMA, V. et al. Coagulase gene polymorphism, enterotoxigenicity, biofilm production, and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine raw milk in North West India. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 16, n. 1, p. 1–14, 2017.

SILVA JÚNIOR, E. A. **Manual de controle higiênico sanitário em serviço de alimentação**. 7. ed. São Paulo: Varela, 2014. 695p.

SILVA, L. C. C. et al. Rastreamento de fontes da contaminação microbiológica do leite cru durante a ordenha em propriedades leiteiras do Agreste Pernambucano. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 1, p. 267–276, 2011.

STROMMINGER, B. et al. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 9, p. 4089-4094, 2003.

SURANINDYAH, Y. et al. The Effect of Improving Sanitation Prior to Milking on Milk Quality of Dairy Cow in Farmer Group. **Procedia Food Science**, v. 3, p. 150–155, 2015.

SVEUM, W. H.; MOBERG, L. J.; RUDE, R. A.; FRANK, J. F. Microbiological monitoring of the food processing environment. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. F.; SPECK, M. L. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3. ed. Washington: APHA, 1992. cap. 3, p. 51-74.

TAFFAREL, L. E. et al. Contagem bacteriana total do leite em diferentes sistemas de ordenha e de resfriamento. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 80, n. 1, p. 7-11, 2013.

TAFFAREL, L. E. et al. Variação da composição e qualidade do leite em função do volume de produção, período do ano e sistemas de ordenha e de resfriamento. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 3, p. 2287-2300, 2015.

- TAKAYAMA, Y. et al. Prevalence of *blaZ* gene and performance of phenotypic tests to detect penicillinase in *Staphylococcus aureus* isolates from Japan. **Annals of Laboratory Medicine**, v. 38, n. 2, p. 155–159, 2018.
- TONDO, E. C.; BARTZ, S. **Microbiologia e Sistemas de Gestão da Segurança de Alimentos**. 1. ed. Porto Alegre: Editoria Sulina, 2011. 263p.
- VALLIN, V. M. et al. Melhoria da qualidade do leite a partir da implantação de boas práticas de higiene na ordenha em 19 municípios da região central do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 1, p. 181–188, 2009.
- VALSANGIACOMO, C. et al. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from hospitalized patients and dairy food (fresh cheese): a survey over a decade in southern Switzerland. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 6, n. 7, p. 393–394, 2000.
- VAS, K. E. et al. Study of Decreased Susceptibility to Vancomycin in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains isolated from a Romanian Multidisciplinary Emergency Hospital. **Romanian Review of Laboratory Medicine**, v. 22, n. 2, p. 245–254, 2014.
- VASCONCELLOS, S. A.; ITO, F. H. Principais zoonoses transmitidas pelo leite. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 9, n. 1, p. 32–37, 2011.
- VENDRAMINI, A. L. DO A. Higiene na Produção. In: NERO, L. A.; DA CRUZ, A. G.; BERSOT, L. DOS S. (Ed.). **Produção, processamento e fiscalização de leite e derivados**. 1. ed. Atheneu: São Paulo, 2017. p. 323–354.
- VESTERHOLM-NIELSEN, M. et al. Occurrence of the *blaZ* gene in penicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Denmark. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 40, n. 3, p. 279–286, 1999.
- WERNCKE, D. et al. Qualidade do leite e perfil das propriedades leiteiras no sul de Santa Catarina: abordagem multivariada. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 2, p. 506–516, 2016.
- WILLERS, C. D. et al. Determination of indirect water consumption and suggestions for cleaner production initiatives for the milk-producing sector in a Brazilian middle-sized dairy farming. **Journal of Cleaner Production**, v. 72, p. 146–152, 2014.
- WOODFORD, N. et al. Application of DNA Probes for rRNA and *vanA* Genes to Investigation of a Nosocomial Cluster of Vancomycin-Resistant Enterococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, n. 3, p. 653–658, 1993.
- YAMAZI, A. K. et al. PRÁTICAS DE PRODUÇÃO APLICADAS NO CONTROLE DE CONTAMINAÇÃO MICROBIANA NA PRODUÇÃO DE LEITE CRU. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 4, p. 610–618, 2010.
- ZEHRRA, A. et al. Molecular characterization of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* from livestock (bovine and swine). **Veterinary World**, v. 10, n. 6, p. 598–604, 2017.
- ZOCCAL, R. Produção Mundial e Brasileira de Leite. In: NERO, L. A.; DA CRUZ, A. G.; BERSOT, L. DOS S. (Ed.). **Produção, processamento e fiscalização de leite e derivados**. 1. ed. Atheneu: São Paulo, 2017. p. 85–96.

ZOCCAL, R.; RENTERO, N. Ações e tendências na indústria de laticínios. Indicadores da produção mundial de leite. Anuário Leite 2018 – Embrapa, p. 17-20, 2018. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/gado-de-leite>>. Acesso em: 01 nov. 2018.

ZSCHECK, K. K.; MURRAY, B. E. Genes involved in the regulation of  $\beta$ -lactamase production in enterococci and staphylococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, n. 9, p. 1966–1970, 2003.

**APÊNDICE 1 - FORMULÁRIO PREENCHIDO DURANTE AS ENTREVISTAS  
REALIZADAS COM PRODUTORES DE LEITE DO MUNICÍPIO DE SÃO JOSÉ  
DOS PINHAIS, PR.**

<b>Propriedade:</b>				<b>Data:</b>	
Mão de obra: ( ) Familiar ( ) Contratada			Tempo na atividade:		Reside na propriedade: Sim Não
Idade			Escolaridade		
<b>Produção leiteira</b>	Animais em lactação				
	Média de produção diária		Média de produção animal		
<b>Manejo de ordenha</b>	Tipo de ordenha				
	Número de ordenhas diárias		Higienização dos utensílios Sim Não	Secagem dos utensílios/teteiras: Invertido / Natural	
	Descarte dos primeiros jatos Sim Não Fundo escuro ( ) Chão ( )			Produto utilizado	
	Uso de panos reutilizáveis Sim Não		Papel toalha Sim Não	Pré-dipping Sim Não	
	Higienização do ordenhador Sim Não			Pós-dipping Sim Não	
	Lava o teto dos animais Sim Não			Alimentação após a ordenha Sim Não	
	Refrigeração do leite após ordenha Sim Não				
	<b>Tratamento de água</b>	Sim Não			
<b>Instalações</b>	Pia/torneira	Teto	Iluminação Sim Não	Piso Sim Não	
	Sim Não	Sim Não	Água encanada Sim Não	Tanque Expansão Imersão	



## ANEXO 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós, Julia Arantes Galvão (professora), Luany Yone Miyoshi (aluna de pós-graduação), Ana Luiza de Souza Reis (aluna de graduação), Letícia Moreira dos Santos (aluna de graduação) - da Universidade Federal do Paraná, estamos convidando o (a) Senhor (a) \_\_\_\_\_, produtor (a) de leite do Município de São José dos Pinhais, cadastrado na Secretaria de Agricultura no município, a participar de um estudo intitulado “Perfil da produção de leite em busca da melhoria da qualidade”.

Com as boas práticas de ordenha e cuidados com os animais, o produtor será bonificado por ter um leite de melhor qualidade. Esse leite será melhor aproveitado na indústria e o consumidor se sentirá mais seguro em consumir esse alimento. Com a pesquisa é esperado apresentar a importância de se obter um leite com boa qualidade microbiológica, beneficiando o consumidor, produtor e animais.

- a) O objetivo desta pesquisa é demonstrar como o perfil da produção familiar baseado nas boas práticas de ordenha influenciam na qualidade microbiológica do leite de propriedades leiteiras no município de São José dos Pinhais, Paraná.

Caso você participe da pesquisa, será necessário responder a um questionário:

- Idade: Qual a sua idade? Qual a idade das pessoas que participam da atividade?
- Tempo na atividade: Há quanto tempo o (a) senhor (a) trabalha nesta atividade?
- Produção: Possui quantos animais em lactação? Qual a média de produção diária? Qual a média de produção animal?
- Estrutura disponível para ordenha (teto, piso, iluminação, instalações): O local de ordenha é coberto? Possui piso? Possui iluminação? Possui pia/torneira, água encanada?
- Armazenamento do leite (tanque de refrigeração): Possui resfriador para armazenamento do leite? O leite é refrigerado após a ordenha?
- Práticas de manejo animal (alimentação, manejos de ordenha): As vacas são alimentadas após a ordenha? Qual o tipo de alimentação? Faz descarte dos primeiros jatos? Utiliza o bezerro ao pé? Faz pré e pós-*dipping*? Utiliza panos? Utiliza papel toalha? Faz higienização dos animais?
- Cuidados sanitários (vacinas, controle de doenças): Vacina os animais? Quais? Realiza o controle de mastite, parasitas? Faz tratamento das vacas secas e de mastites?
- Forma de obtenção do leite (tipo de ordenha e número de ordenhas, higienização): Qual o tipo de ordenha utilizada? Realiza quantas ordenhas por dia? Faz higienização dos ordenhadores? Faz higienização dos utensílios?

E disponibilizar um dia para coleta de amostras durante a ordenha dos animais, o que levará aproximadamente 2 horas. As amostras incluem 500 mL de leite, água, bem como permitir a análise da microbiota presente nas mãos, utensílios e equipamentos que será coletada por meio de suabes (hastes de algodão).

Participante da Pesquisa e/ou Responsável Legal [rubrica]  
 Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE [rubrica]  
 Orientador [rubrica]

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde/UFPR.  
 Parecer CEP/SD-PB nº 232/636  
 na data de 11/10/2013

Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde da UFPR | CEP/SD  
 Rua Padre Camargo, 285 | térreo | Alto da Glória | Curitiba/PR | CEP 80060-240 |  
 cometica.saude@ufpr.br - telefone (041) 3360-7259

## ANEXO 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

2

As análises dessas amostras serão realizadas no Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança de Alimentos da Universidade Federal do Paraná (LACQSA - UFPR), tendo como responsável a professora orientadora Julia Arantes Galvão.

- b) Para tanto você deverá estar na propriedade na região rural de São José dos Pinhais, PR para responder ao questionário e disponibilizar as amostras, o que levará aproximadamente 2 horas.
- c) É possível que o (a) senhor (a) experimente algum desconforto, principalmente relacionado a aplicação dos questionários ou coleta de amostra da superfície das mãos por meio das hastes de algodão.
- d) Alguns riscos relacionados ao estudo podem ser a timidez ou a revelação das ações no manejo de ordenha. A assinatura do TCLE não minimiza o risco proposto.
- e) Os benefícios esperados com essa pesquisa: é esperado apresentar a importância de se obter um leite com boa qualidade microbiológica, beneficiando o consumidor, produtor e animais, embora nem sempre você seja diretamente beneficiado por sua participação neste estudo. Também haverá treinamento com distribuição de folhetos informativos sobre as boas práticas de ordenha.
- f) Os pesquisadores Julia Arantes Galvão (professora), Luany Yone Miyoshi (aluna de pós-graduação), Ana Luiza de Souza Reis (aluna de graduação) e Letícia Moreira dos Santos (aluna de graduação) responsáveis por este estudo poderão ser localizados no Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança de Alimentos da Universidade Federal do Paraná (LACQSA), tendo como responsável a professora orientadora Julia Arantes Galvão, setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná. Rua dos Funcionários, 1540, Juvevê. E-mails: juliaarantesgalvao@gmail.com, luanymiyoshi@gmail.com, analuudb@gmail.com, le.moreira18@hotmail.com. Telefone: (41) 3350-5811, no horário 8:00-18:00 horas, para esclarecer eventuais dúvidas que o (a) senhor (a) possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.

- g) A sua participação neste estudo é voluntária e se o (a) senhor (a) não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado. O seu atendimento por parte da Secretaria de Agricultura está garantido e não será interrompido caso o (a) senhor (a) desista de participar.

- h) As informações relacionadas ao estudo poderão ser conhecidas por pessoas autorizadas, como a Secretaria de Agricultura de São José dos Pinhais. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a sua identidade seja preservada e mantida sua confidencialidade, bem como o caráter anônimo dos ordenhadores será mantido e suas identidades serão protegidas.

Participante da Pesquisa e/ou Responsável Legal [rubrica]  
 Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE [rubrica]  
 Orientador [rubrica]

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa  
 em Seres Humanos do Setor de Ciências da  
 Saúde/UFPR.  
 Parecer CEP/SD-PB nº 2323/636  
 na data de 11/10/2017. gff

Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde da UFPR | CEP/SD  
 Rua Padre Camargo, 285 | térreo | Alto da Glória | Curitiba/PR | CEP 80060-240 |  
 cometica.saude@ufpr.br - telefone (041) 3360-7259



## ANEXO 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

3

- i) Declaramos que os dados coletados serão de uso para o desenvolvimento da pesquisa em questão, porém as cepas bacterianas - e não a amostra em si - provenientes do material biológico (superfície dos tetos dos animais, superfície dos utensílios e equipamentos, água residual de utensílios, mãos dos ordenhadores, teteiras, leite do resfriador) poderão ser armazenadas, e neste caso, lacradas, identificadas em congelador do LACQSA-UFPR para reutilização em pesquisas complementares, conforme o disposto na Resolução 441/2011 (CNS), Portaria 2201/2011 (MS) e Resolução 40/12 (CEPE-UFPR) - que tratam de Biobanco e Biorrepositório. O responsável pelo armazenamento, caso haja será a professora orientadora Julia Arantes Galvão.
- j) As despesas necessárias para a realização da pesquisa não são de sua responsabilidade e o (a) senhor (a) não receberá qualquer valor em dinheiro pela sua participação.
- k) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como participante de pesquisa, você pode contatar também o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP/SD) do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, pelo telefone 3360-7259.

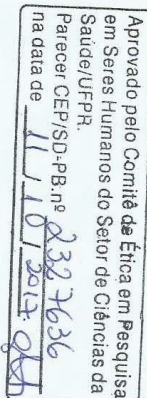
Eu, \_\_\_\_\_ li esse Termo de Consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem qualquer prejuízo para mim.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

Curitiba, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Participante de Pesquisa ou Responsável Legal

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE





## ANEXO 2 - APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS DA UFPR

UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS  
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO PARANÁ -



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Perfil da Produção de leite em busca da melhoria da qualidade

Pesquisador: JULIA ARANTES GALVAO

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 68247417.2.0000.0102

Instituição Proponente: Departamento de Medicina Veterinária

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.327.636

#### Apresentação do Projeto:

Projeto de pesquisa proveniente do Departamento de Medicina Veterinária sob a responsabilidade da Profa. Dra. Julia Arantes Galvão que será executado com a colaboração das pós-graduanda Luany Yone Miyoshi e das graduandas Ana Luiza de Souza Reis e Letícia Moreira dos Santos. A pesquisa será desenvolvida em São José dos Pinhais com produtores de leite cadastrados na Secretaria de Agricultura do referido município.

#### Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Demonstrar como o perfil da produção familiar baseado nas boas práticas de ordenha influenciam na qualidade microbiológica do leite de propriedades leiteiras no município de São José dos Pinhais, Paraná.

Objetivo Secundário:

- Realizar análises microbiológicas de amostras do leite, equipamentos, utensílios, água, superfície dos tetos

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - Térreo

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.060-240

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

## ANEXO 2 - APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS DA UFPR

UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS  
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO PARANÁ -



Continuação do Parecer: 2.327.698

dos animais e mãos dos ordenhadores.

- Relacionar os melhores resultados aos ordenhadores que afirmam realizar mais adequadamente as boas práticas de ordenha, bem como oferecer treinamento e avaliação de resultados."

### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

De acordo com a autora principal, "o produtor será bonificado por ter um leite de melhor qualidade. Esse leite será melhor aproveitado na indústria e o consumidor se sentirá mais seguro em consumir esse alimento.

A pesquisa apresenta o risco da quebra de confidencialidade referente às práticas executadas no processo de ordenha, no sentido de ter as práticas divulgadas, bem como o desconforto que pode ser resultado da aplicação dos questionários, e também da aplicação de suaves para verificação da contaminação das mãos, no entanto busca-se minimizar esses problemas com o oferecimento do Termo de consentimento livre e esclarecido, bem como a possibilidade de os participantes desistirem de participar da pesquisa caso não se sintam confortáveis.

### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

"Serão estudadas 42 propriedades leiteiras do município de São José dos Pinhais, PR, cadastradas na Secretaria da Agricultura do município e que fornecem leite para uma indústria sob sistema de inspeção estadual (Serviço de Inspeção do Paraná – SIP)." "Os produtores serão entrevistados e aplicadas listas de verificação, considerando itens referentes ao seu perfil socioeconômico, estrutura disponível para ordenha e armazenamento do leite, práticas de manejo animal, cuidados sanitários e a forma de obtenção do leite."

"Para o levantamento do perfil da produção de leite nas propriedades estudadas serão avaliadas as entrevistas aplicadas por meio de listas de verificação compostas por informações qualitativas e quantitativas. As respostas das entrevistas serão anotadas e não gravadas, portanto não necessitam de destruição da gravação. Após a avaliação e interpretação dos dados serão realizadas coletas de amostras

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - Térreo  
Bairro: Alto da Glória  
UF: PR Município: CURITIBA  
Telefone: (41)3360-7259

CEP: 80.060-240

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

## ANEXO 2 - APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS DA UFPR

UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS  
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO PARANÁ -



Continuação do Parecer: 2.327.636

de cada propriedade para avaliação microbiológica. As amostras serão: superfície dos tetos dos animais, superfície dos utensílios e equipamentos, água residual de utensílios, mãos dos ordenhadores, teteiras, leite do resfriador. Todas as coletas serão realizadas com técnicas assépticas e as amostras serão transportadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável até o Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança de Alimentos

da Universidade Federal do Paraná, onde serão analisadas em até duas horas após a chegada ao laboratório. Serão pesquisados os seguintes micro-organismos: aeróbios mesófilos, coliformes totais e termotolerantes, estafilococos e Salmonella. As análises serão executadas seguindo a Instrução Normativa 62. Os resultados obtidos serão avaliados comparando-se com os valores de referência descritos na Instrução Normativa 62. Finalizado período de análises, as amostras ficarão armazenadas sob congelamento por até 7 dias e posteriormente serão descartadas em lixo comum e para material biológico. As variáveis qualitativas serão avaliadas pelo teste qui-quadrado e as quantitativas pelo teste T, utilizando-se o programa estatístico ASSISTAT, versão 7.7 beta, adotando-se, em ambos os casos, o nível de significância de até 5% ( $p < 0,05$ ). Imediatamente após a avaliação inicial da qualidade do leite serão realizadas quatro palestras técnicas e quatro treinamentos práticos, ambos coletivos.

Serão disponibilizados materiais didáticos a cada produtor, cartilhas e folders, contendo todas as informações necessárias para a correta implantação das boas práticas de higiene na ordenha. Cada palestra terá duração de 1 hora e cada treinamento nas propriedades 1 hora e 30 minutos. Sete meses após o treinamento serão realizadas novas visitas e coletas de leite nas propriedades para a verificação da implantação das práticas pelos produtores e o impacto destas na qualidade do leite produzido."

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - Térreo

Bairro: Alto da Glória

UF: PR

Município: CURITIBA

CEP: 80.060-240

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br



## ANEXO 2 - APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS DA UFPR

UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS  
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO PARANÁ -



Continuação do Parecer: 2.327.636

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

o uso em pesquisas futuras deve ser mediante novo TCLE . Informar

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

As pendências foram atendidas entretanto é importante que fique caracterizado no TCLE que o uso futuro do material armazenado (cepas) será possível mediante submissão de novo projeto de pesquisa ao comitê de ética e autorização do produtor por meio de TCLE.

- É obrigatório retirar na secretaria do CEP/SD uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido com carimbo onde constará data de aprovação por este CEP/SD, sendo este modelo reproduzido para aplicar junto ao participante da pesquisa.

O TCLE deverá conter duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma cópia ficará com o participante da pesquisa (Carta Circular nº. 003/2011 CONEP/CNS).

Favor agendar a retirada do TCLE pelo telefone 41-3360-7259 ou por e-mail [cometica.saude@ufpr.br](mailto:cometica.saude@ufpr.br), necessário informar o CAAE.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais e final, sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos, através da Plataforma Brasil - no modo: NOTIFICAÇÃO. Demais alterações e prorrogação de prazo devem ser enviadas no modo EMENDA. Lembrando que o cronograma de execução da pesquisa deve ser atualizado no sistema Plataforma Brasil antes de enviar solicitação de prorrogação de prazo.

Emenda – ver modelo de carta em nossa página: [www.cometica.ufpr.br](http://www.cometica.ufpr.br) (obrigatório envio)

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_018537.pdf	20/09/2017 11:41:59		Aceito
Outros	respostas_pendencia_3.docx	20/09/2017 11:40:46	JULIA ARANTES GALVAO	Aceito
Declaração de	Declaracao_de_uso_especifico_do_m	20/09/2017	JULIA ARANTES	Aceito

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - Térreo

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.060-240


UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: [cometica.saude@ufpr.br](mailto:cometica.saude@ufpr.br)

## ANEXO 2 - APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS DA UFPR

<b>UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ -</b>	
--	---

Continuação do Parecer: 2.327.898

Manuseio Material Biológico / Biorrepositório / Biobanco	arterial_eou_dados_coletados_corrigido_2.pdf	11:40:25	GALVAO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_consentimento_livre_e_esclarecido_TCLE_corrigido_3.docx	20/09/2017 11:40:12	JULIA ARANTES GALVAO	Aceito
Brochura Pesquisa	projeto_detalhado_corrigido_3.docx	20/09/2017 11:39:52	JULIA ARANTES GALVAO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_consentimento_livre_e_esclarecido_TCLE_corrigido_2.docx	18/08/2017 10:28:42	JULIA ARANTES GALVAO	Aceito
Outros	respostas_pendencia_2.docx	18/08/2017 10:28:27	JULIA ARANTES GALVAO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_detalhado_corrigido_2.docx	18/08/2017 10:27:54	JULIA ARANTES GALVAO	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorrepositório / Biobanco	Declaracao_de_uso_especifico_do_material_eou_dados_coletados_corrigido.pdf	18/08/2017 10:27:37	JULIA ARANTES GALVAO	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	11/05/2017 16:25:09	JULIA ARANTES GALVAO	Aceito
Outros	checklist.pdf	10/05/2017 15:03:33	JULIA ARANTES GALVAO	Aceito
Outros	Termo_de_responsabilidades_no_projeto.pdf	10/05/2017 15:03:16	JULIA ARANTES GALVAO	Aceito
Outros	Termo_de_compromisso_para_o_inicio_da_pesquisa.pdf	10/05/2017 15:02:56	JULIA ARANTES GALVAO	Aceito
Outros	Declaracao_de_tornar_publicos_os_resultados.pdf	10/05/2017 15:02:20	JULIA ARANTES GALVAO	Aceito
Outros	Termo_de_confidencialidade.pdf	10/05/2017 14:58:12	JULIA ARANTES GALVAO	Aceito
Outros	Analise_de_merito_comprovante_de_qualificacao_ou_agencia_de_fomento.pdf	10/05/2017 14:57:58	JULIA ARANTES GALVAO	Aceito
Outros	Ata_de_aprovacao_do_projeto.pdf	10/05/2017 14:57:37	JULIA ARANTES GALVAO	Aceito
Outros	Oficio_do_pesquisador_encaminhando_o_projeto_ao_CEPED.pdf	10/05/2017 14:57:20	JULIA ARANTES GALVAO	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - Térreo  
Bairro: Alto da Glória  
UF: PR Município: CURITIBA  
Telefone: (41)3360-7259

CEP: 80.060-240

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

## ANEXO 2 - APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS DA UFPR

UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS  
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO PARANÁ -



Continuação do Parecer: 2.327.636

Não

CURITIBA, 11 de Outubro de 2017

---

Assinado por:  
IDA CRISTINA GUBERT  
(Coordenador)

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - Torres  
Bairro: Alto da Glória  
UF: PR Município: CURITIBA  
Telefone: (41)3360-7259

CEP: 80.060-240

E-mail: cometica.saude@ufpr.br



## ANEXO 3 - APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo número 034/2017, referente ao projeto “**PERFIL DA PRODUÇÃO FAMILIAR E CONTAMINAÇÃO BACTERIANA DO LEITE NO MUNICÍPIO DE SÃO JOSÉ DOS PINHAIS, PARANÁ**”, sob a responsabilidade de **Julia Arantes Galvão** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro, de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - BRASIL, com grau I de invasividade, em reunião de 05/05/2017.

Vigência do projeto	Agosto/2017 até Março/2019
Especie/Linhagem	<i>Bos</i> sp. (bovino) / Raças leiteiras mestiças
Número de animais	760
Peso/Idade	650 kg / Variada
Sexo	Fêmea
Origem	Propriedades rurais em São José dos Pinhais, Paraná

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 034/2017, regarding the project “**FAMILIAR MILK FARMING PROFILE AND BACTERIAL CONTAMINANTS IN MILK FROM SÃO JOSÉ DOS PINHAIS, PARANA, BRAZIL**” under **Julia Arantes Galvão** supervision – which includes the production, maintenance and/or utilization of animals from Chordata phylum, Vertebrata subphylum (except Humans), for scientific or teaching purposes – is in accordance with the precepts of Law nº 11.794, of 8 October, 2008, of Decree nº 6.899, of 15 July, 2009, and with the edited rules from Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), and it was approved by the ANIMAL USE ETHICS COMMITTEE OF THE AGRICULTURAL SCIENCES CAMPUS OF THE UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (Federal University of the State of Paraná, Brazil), with degree I of invasiveness, in session of 05/05/2017.

Duration of the project	August/2017 until March/2019
Specie/Line	<i>Bos</i> sp. (bovine) / Crossbred dairy cattle
Number of animals	760
Weight/Age	650 kg / Variable
Sex	Female
Origin	Rural properties in São José dos Pinhais, Paraná

Curitiba, 5 de maio de 2017.

Chayane da Rocha  
Coordenadora CEUA-SCA